
Analyse einer divergenten Promotorregion in *Halobacterium salinarum*: Wirkung einzelner Promotorelemente und Stärke der Aktivierung



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Biol. Larissa Renée Marschaus

aus Hanau

Berichterstatlerin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Mitberichterstatler: PD Dr. Arnulf Kletzin

Tag der Einreichung: 10.07.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2012

Darmstadt 2012

D 17

Für meinen Vater

Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung.

Carles Darwin (1809-1882)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas, die Möglichkeit zur Durchführung der Promotion in ihrer Arbeitsgruppe und die wissenschaftliche Freiheit bei der Gestaltung dieser Arbeit. Desweiteren für eine allzeit offene Tür und einer damit verbundenen steten Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente.

Ganz herzlich danke ich Herrn PD Dr. Arnulf Kletzin für seine geduldige Hilfe bei jeglichen Problemen im Labor und am Computer, für ein immer offenes Ohr und die vielen wissenschaftlichen Ratschläge und Diskussionen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde und ehemaligen Kollegen aus der AG Pfeifer und AG Kletzin Dr. Torsten Hechler, Katharina Lampert, Ina Schmidt, Anne Bleiholder, Regina Frommherz, Dennis Petrasch, Michael Forth, Miriam Schenk und Matti Eckert für ihre Hilfsbereitschaft und das humorvolle Arbeitsklima. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Sabrina Fröls, Dr. Andreas Veith und Stella Tavlaridou für die gemeinsamen Zeiten auf dem „Balkon“, die permanente Bereitschaft zur fachlichen und persönlichen Unterstützung und die stets konstruktiven Diskussionen.

Den guten Seelen des Labors Gaby Liebing, Karin Faist und Renate Fröhlich danke ich sehr herzlich für die Unterstützung, die Hilfsbereitschaft, die guten Gespräche und die exzellente Organisation des Laboralltages. Bei Nam-Suk Polin, Cordula Bernhard, Karin Papalau und Gisela Schaffert möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und Unterstützung bedanken. Die allmorgendliche Kaffee- und Teerunde wird mir fehlen. Danke an Giuseppe Vetrano für die nette Begrüßung am Morgen, das Lachen, bei dem immer die Sonne aufgeht und die lustigen Plauschereien auf den Gängen.

Allen Kollegen der weiteren aktuellen und ehemaligen Arbeitsgruppen vom dritten Stock (besonders Tamara Heß) danke ich für die Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung, das Verständnis und das stetige „Du schaffst das“.

Sabine Schneider danke ich für ihre Freundschaft, die vielen fachübergreifenden Diskussionen, das gemeinsame Durchleben aller Hochs und Tiefs seit Beginn des Studiums und den gegenseitigen Input während der Promotion.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater für seine unermüdliche Unterstützung, seine Geduld, und dafür, dass er mir immer zur Seite steht, mich motiviert und mir meine Stärken aufzeigt.

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Transkription und Transkriptionsregulatoren in Archaea	5
2.2	Halophile Archaea und Haloadaptation	8
2.3	Gasvesikel	11
2.4	<i>Haloferax volcanii</i> : ein halophiler Modellorganismus zum Studium von haloarchaealen Genfunktionen und Proteinen	12
2.5	Gasvesikel-kodierende Genregionen bei Haloarchaea	13
2.6	Der Transkriptionsaktivator GvpE	15
2.7	Regulation der Gasvesikelbildung	17
2.8	Ziel der Arbeit	20
3	Material und Methoden	22
3.1	Materialien	22
3.1.1	Chemikalien und Hilfsmittel	22
3.1.2	Enzyme und Kits	24
3.1.3	Größenstandards	24
3.1.4	Synthetische Oligonukleotide	25
3.1.5	Verwendete Mikroorganismen	26
3.1.6	Verwendete Plasmidvektoren (Antibiotikaresistenzen)	27
3.2	Molekularbiologische Methoden	27
3.2.1	Wachstumsbedingungen	27
3.2.2	Wachstumskurven von <i>Hfx. volcanii</i> WFD11-Transformanten	27
3.2.3	Transformation von <i>E. coli</i>	28
3.2.4	Konstrukt für die Transformation von <i>E. coli</i> M15	28
3.2.5	Konstrukt für die Transformation von <i>E. coli</i> BL-21(DE3)	28
3.2.6	Transformation von <i>Haloferax volcanii</i> WFD11	28
3.2.7	Konstrukte für die Transformation von <i>Haloferax volcanii</i> WFD11	29
3.2.8	Plasmidisolierung aus <i>Hfx. volcanii</i>	36
3.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.2.10	Ortsspezifische Mutagenese-PCR	37
3.2.11	Molekularbiologische Standardtechniken	39
3.2.12	Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analysen	39
3.2.13	Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden	40
3.2.14	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>Haloferax volcanii</i>	40
3.2.15	Northern-Analyse	41
3.2.16	Dot-Blot-Analyse	41
3.2.17	Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden	42
3.2.18	Hydrolyse von DNA in isolierter Gesamt-RNA	43
3.2.19	Reverse Transkription (RT-Reaktion)	43
3.2.20	Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)	44

3.2.21	Quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR)	44
3.3	Proteinchemische Methoden	46
3.3.1	Isolierung von Proteinen aus <i>Haloferax volcanii</i> für Western-Analysen	46
3.3.2	Isolierung der löslichen Proteinfraction aus <i>Hfx. volcanii</i> für <i>in vitro</i> -Studien ..	46
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	47
3.3.4	Analyse der BgaH-Aktivität (ONPG-Test)	47
3.3.5	Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese	48
3.3.6	Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen	49
3.3.7	Nachweis von Proteinen mittels Western-Analysen	49
3.3.8	Rekombinante Expression und Reinigung von His-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	50
3.3.9	Affinitätschromatographie mit gebundenen His-Proteinen für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Untersuchung zur Funktion einzelner Elemente der P_{pD} - und P_{pA} -Promotorregion	53
4.1.1	Substitutionsmutagenese der GvpE-UAS von P_{pA} und P_{pD}	53
4.1.1.1	Untersuchung von E-UAS _A im p-gvpD- P_{pD} - P_{pA} -bgaH-Konstrukt (pDpA-Konstrukt)	54
4.1.1.2	Untersuchungen an der GvpE-UAS des P_{pD} -Promotors	65
4.1.2	scanning Mutagenese des P_{pD} -Promotors	77
4.1.2.1	Herstellung der P_{pD} -Mutanten	78
4.1.2.2	Analyse der basalen P_{pD} -Aktivität in den scanning Mutanten	79
4.1.2.3	Analyse der pGvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivierung	81
4.1.3	Einfluss von GvpE-UAS, BRE und TATA-Box auf die Promotoraktivität von P_{pD} und P_{pA} – Analyse von Promotorchimären	83
4.1.3.1	Analyse der basalen und pGvpE-vermittelten P_{pA} -Aktivität in den Promotorchimären	86
4.1.3.2	Analyse der basalen und pGvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivität in den Promotorchimären	89
4.2	Untersuchung der Interaktionsfähigkeit verschiedener cGvpE-Mutanten mit dem Transkriptionsfaktor B (TFB)	96
4.2.1	Interaktionsstudien mit TfbC und den cGvpE-Mutanten (cGvpE _{AH4} , cGvpE _{Zip} oder cGvpE _{Asp})	99
4.2.2	Herstellung von weiteren cGvpE-Substitutionsmutanten und Untersuchung ihrer aktivierenden Funktion	103
4.2.3	Interaktionsstudien der cGvpE-Substitutionsmutanten mit TfbC	107
5	Diskussion	110
5.1	GvpE-UAS-Elemente haben unterschiedliche Signifikanz für P_{pA} und P_{pD}	111
5.2	Der Bereich stromab der TATA-Box ist wichtig für die basale und GvpE-induzierte P_{pD} -Aktivität	120
5.3	Transfer von Promotorelementen des P_{pA} -Promotors zu P_{pD} stärkt die Aktivität von P_{pD} und zeigt die Bedeutung von BRE	125

5.4	AH4, bZIP sowie konservierte Aspartat- und Tyrosin-Reste des cGvpE-Proteins sind nicht an der Interaktion mit TfbC beteiligt	132
5.5	Fazit und Ausblick	136
6	Literatur	138
7	Anhang	145
7.1	Abkürzungen	145
7.2	Publikationen	148
7.3	Lebenslauf	149
7.4	Erklärung	150

1 Zusammenfassung

Das halophile Archaeon *Halobacterium salinarum* PHH1 bildet Gasvesikel über 14 *gvp*-Gene, die in den zwei gegenläufig orientierten Genclustern *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* angeordnet sind. Die Promotoren der Gene *gvpA* (P_A) und *gvpD* (P_D) sind nur 35 Nukleotide voneinander getrennt. P_A weist dabei die stärkere, P_D eine schwächere Aktivität auf. Reguliert wird die Gasvesikelbildung durch den Transkriptionsaktivator GvpE, während GvpD an der Repression beteiligt ist. Für die GvpE-vermittelt Aktivierung der Promotoren P_A und P_D ist jeweils eine 20 Nukleotide (nt) lange GvpE *upstream activator sequence* (GvpE-UAS) notwendig, die an das Promotormotiv BRE angrenzt, das dem Transkriptionsfaktor B (TFB) als Erkennungsstelle dient. Die GvpE-UAS enthält zwei 8 nt langen Elemente (1+2), die durch 4 nt voneinander getrennt sind. Aufgrund des geringen räumlichen Abstands von P_A und P_D überlappen die beiden distalen GvpE-UAS-Elemente 1A und 1D im Zentrum der intergenen Region fast vollständig.

Die Eigenschaften der GvpE-UAS von P_A und P_D wurden näher untersucht. Dafür wurden Substitutionsmutagenesen durchgeführt, um die Signifikanz der 8-nt Elemente 1A+2A, sowie 1D+2D für die Aktivierung des entsprechenden Promotors *in vivo* zu bestimmen. Die beiden Promotoren wurden dazu sowohl einzeln (P_A -*bgaH* und P_D -*bgaH* Konstrukte) als auch in dualen Promotorkonstrukten (pApD-*bgaH* und pDpA-*bgaH*) bezüglich ihrer basalen und GvpE-induzierten Aktivität in *Haloferax volcanii* Transformanten untersucht. Der *bgaH*-Leserahmen diente dabei als Reporter; die BgaH-Aktivität kann über einen ONPG-Test quantifiziert werden. In den dualen Promotorkonstrukten wurde die Aktivität des jeweilig anderen Promotors über die Menge der p-*gvpA*- bzw. p-*gvpD*-Transkripte bestimmt.

Die Substitution von einem der beiden P_A -GvpE-UAS-Elemente 1A oder 2A mit einer *nonsense* Sequenz (1A+ Δ 2A bzw. Δ 1A+2A) führte zu einem Verlust der Aktivierung von P_A , während die Konfiguration 1A+1A der P_A -GvpE-UAS eine Reduktion der Aktivierung zur Folge hatte. Die basale und GvpE-stimulierte Promotoraktivität von P_D blieb dagegen - mit der Ausnahme von Δ 1A+2A - durch diese P_A -GvpE-UAS-Substitutionen unbeeinflusst: Die Substitution Δ 1A+2A der P_A -GvpE-UAS führte zu einer Reduktion der GvpE-vermittelten P_D -Aktivierung. Bei der Aktivatorsequenz von P_D führte die Konfiguration 1D+1D zu einem Verlust (Einzelpromotorkonstrukt) bzw. einer starken Einschränkung (duales Promotorkonstrukt) der GvpE-Aktivierung, was für eine sehr starke Orientierung der GvpE-UAS 1A/1D-Sequenz in Richtung P_A spricht. Dies gewährleistet wahrscheinlich die effizientere Aktivierung von P_A im Vergleich zu P_D . Auch P_D war in der GvpE-UAS-Konfiguration Δ 1D+2D bzw. 1D+ Δ 2D nicht mehr aktivierbar. Für

die GvpE-vermittelte Aktivierung beider Promotoren ist deshalb eine vollständige GvpE-UAS aus zwei funktionalen 8-nt-Elementen notwendig. Die Konfiguration 2D+2D stimulierte den P_D Promoter fast wie die Wildtyp-Konfiguration 1D+2D. Die basale und GvpE-stimulierte Promotoraktivität von P_A wurde durch diese P_D -GvpE-UAS-Substitutionen nicht beeinflusst.

Die nahe Lokalisation der GvpE-UAS zur TFB-Bindestelle BRE impliziert, dass GvpE und TFB interagieren. Die Interaktion zwischen TfbC und GvpE wurde mittels Affinitätschromatographie gezeigt. Hier wurden auch verschiedene GvpE-Mutanten analysiert, die ihre Aktivatorfunktion verloren haben. Alle untersuchten GvpE-Mutanten hatten aber noch die Fähigkeit zur Interaktion mit TfbC.

Um die Ursache für die Unterschiede in der Promotoraktivität von P_A und P_D zu bestimmen, wurden Promotorchimären hergestellt, bei denen die Motive BRE, TATA-Box und GvpE-UAS einzeln oder gemeinsam ausgetauscht waren. Durch den Austausch der GvpE-UAS wurde die Stärke der GvpE-vermittelten Promotoraktivierung ermittelt. P_D wurde mit der P_A -GvpE-UAS stärker und *vice versa* P_A mit der P_D -GvpE-UAS schwächer durch GvpE aktiviert. Alle P_A -Motive waren in der Umgebung von P_D funktional und der Austausch von BRE und/oder TATA-Box führte jeweils zu einer Erhöhung der GvpE-Aktivierung der P_D -Chimäre. Dadurch wurde die Wichtigkeit von BRE_A und TATA-Box_A für die Stärke von P_A belegt. Im Gegensatz dazu bewirkte BRE_D in der P_A -Chimäre eine starke Reduktion der Basalaktivität und der GvpE-vermittelten Aktivierung. TATA_A konnte jedoch gegen TATA_D ohne Beeinflussung der Aktivität ausgetauscht werden. Die vollständige Inversion aller Promotorelemente übertrug die stärkere P_A -Aktivität auf P_D und *vice versa* die schwächere P_D -Aktivität auf P_A . Somit tragen alle Elemente des P_A Promoters zur Stärke der Expression bei.

Für P_D wurde auch die Region zwischen TATA-Box und Transkriptionsstart durch eine 4-nt *scanning* Mutagenese gezielt analysiert. Es wurde ein neues regulatorisches Element zwischen TATA_D und dem Transkriptionsstart identifiziert, das für die basale P_D -Aktivität wichtig ist. Ein ähnliches Element existiert für P_A nicht. Wegen des Funktionsverlustes von BRE_D in der Umgebung von P_A und dem neuen regulatorischen Element in P_D könnte P_D von einem anderen TFB-Protein erkannt und gebunden werden als P_A . Dies wäre eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche, wachstumsphasenabhängige Aktivität beider Promotoren.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits publiziert:

Bauer, M., **Marschaus, L.**, Reuff, M., Besche, V., Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2008). Overlapping activator sequences determined for two oppositely oriented promoters in halophilic Archaea. *Nucleic Acids Res* 36(2): 598-606.

Scheuch, S., **Marschaus, L.**, Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2008). Regulation of gvp genes encoding gas vesicle proteins in halophilic Archaea. *Arch Microbiol* 190, 333-340.

Pfeifer, F., Frommherz, R., Faist, K., Hechler, T., Teufel, K. & **Marschaus, L.** (2011). Effect of anoxic conditions and temperature on gas vesicle formation in *Halobacterium salinarum*. In: *Halophiles and Hypersaline Environments* (Ed. Ventosa, A., Oren, A., Ma, Y.), Springer Verlag, Chapter 13, pp 237-248.

Marschaus, L. & Pfeifer, F. (2012). A dual promoter region with overlapping activator sequences drives the expression of gas vesicle protein genes in haloarchaea. *Microbiology* (eingereicht).

2 Einleitung

Die Einteilung aller Lebewesen in die drei Domänen Bacteria, Archaea und Eukarya wurde erstmalig von Carl Woese aufgrund vergleichender Sequenzanalysen der 16S und 18S rRNA vorgeschlagen (Woese & Fox 1977; Woese *et al.*, 1990). Der rRNA Stammbaum zeigt, dass sich aus phylogenetischer Sicht die Domäne der Archaea aus den Phyla Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota und Nanoarchaeota zusammensetzt (Abb. 1).

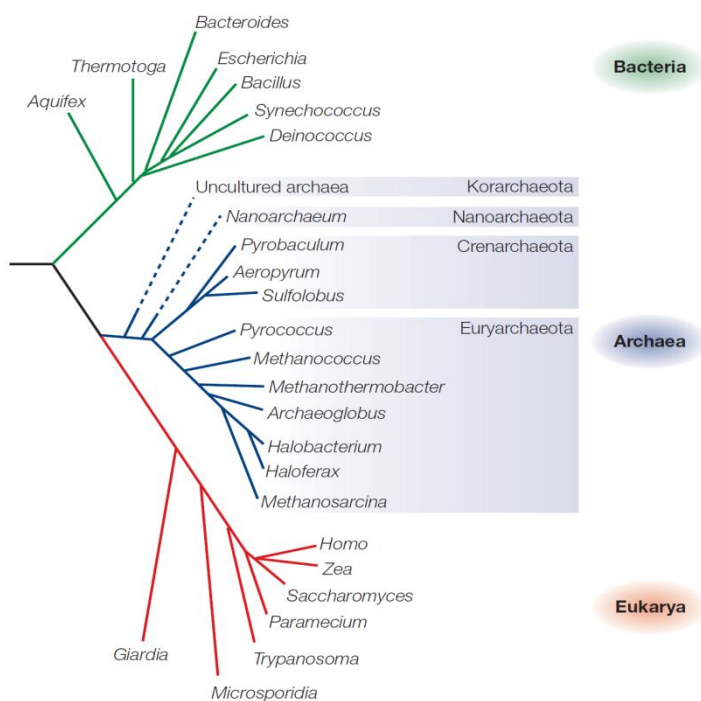


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S bzw. 18S rRNA-Sequenzvergleichen als molekulare Chronometer (aus Allers & Mevarech, 2005). Die Abzweigungen der Korarchaeota und der Nanoarchaea sind als gestrichelte Linie dargestellt, da ihre Abzweigung im Stammbaum noch ungewiss ist (Huber *et al.*, 2002; Allers & Mevarech, 2005).

Viele bisher kultivierte Archaea gelten als extremophil, da sie Lebensräume besiedeln, die von extremen Umweltbedingungen geprägt sind. Diese Habitate zeichnen sich durch extreme abiotische Faktoren wie hohe Salzbedingungen, sehr basische oder saure pH-Werte, hohe Temperatur und/oder hohem Druck aus. Das Vorkommen der Archaea ist aber nicht nur auf extreme Standorte beschränkt, vielmehr sind sie ubiquitär verbreitet und machen mehr als 20% der Biomasse aus (DeLong & Pace, 2001). Im Reich der Crenarchaeota sind zum Beispiel Vertreter zu finden, die entweder an die in der Natur herrschenden extrem heißen oder kalten Temperaturen adaptiert sind. Die Euryarchaeota stellen die diverseste Gruppe dar. Zu diesem Phylum gehören unter anderen die Methanogenen und die Halophilen. Die halophilen Vertreter besiedeln äußerst salzhaltige

Umgebungen wie natürliche Salzseen oder künstlich angelegte Meersalzsalinen. Die Korarchaeota sind bislang überwiegend durch DNA Sequenzanalysen aus der Umwelt bekannt (Barns *et al.*, 1996; Reysenbach *et al.*, 2000; Auchung *et al.*, 2006). Eine erfolgreiche Kultivierung ist bisher nur für einen Vertreter dieser Gruppe beschrieben (Elkins *et al.*, 2008). Im Reich der Nanoarchaeota ist als einziger bekannter Vertreter das parasitische Archaeon *Nanoarchaeum equitans* zu finden, welches in Cokultur mit dem Crenarchaeoten *Ignicoccus hospitalis* lebt (Huber *et al.*, 2002).

Archaea sind monophyletisch und besitzen sowohl einzigartige Charakteristika als auch Eigenschaften, die sie mit den Bacteria und Eukarya teilen. Der Aufbau der Zellmembranen gehört zu den wichtigen charakteristischen Merkmalen der Archaea. Im Gegensatz zu den Bacteria und Eukarya, deren Zellmembran aus Fettsäureesterlipiden aufgebaut ist, besteht die archaeale Zellmembran aus Phytanyletherlipiden (Woese *et al.*, 1978). Ein weiteres Merkmal ist die Zellwand, deren Aufbau innerhalb der drei Domänen stark variiert. Anstatt des bei Bacteria vorkommenden Mureinsacculus besteht die Zellwand der Archaea aus Pseudomurein, Heteropolysacchariden, Proteinen oder Glykoproteinen (Kandler & König, 1998).

Neben diesen Unterschieden weisen die Archaea auch Gemeinsamkeiten mit den Bacteria und Eukarya auf. Informationsverarbeitende Prozesse wie DNA-Replikation, Transkription und Translation sind den eukaryotischen Systemen bedeutend ähnlicher als den bakteriellen (Huet *et al.*, 1983; Dennis, 1997; Bell & Jackson, 2001; Bell *et al.*, 2001b; Grabowski & Kelman, 2003). Interessanterweise zeigen Genomanalysen, dass Archaea zahlreiche Transkriptionsregulatoren besitzen, die zu bakteriellen Genregulatoren homolog sind (Aravind & Koonin, 1999). Die genomische Organisation und der zentrale Metabolismus der Archaea sind ebenfalls eher mit den Bacteria vergleichbar (Rivera *et al.*, 1998).

2.1 Transkription und Transkriptionsregulatoren in Archaea

Das informationsverarbeitende System der Archaea zeigt zu dem der Eukaryoten eine hohe Ähnlichkeit (Huet *et al.*, 1983). Archaea besitzen eine RNA-Polymerase (aRNAP), deren Untereinheiten homolog zu denen der eukaryotischen RNA-Polymerase II sind (Langer *et al.*, 1995; Bell & Jackson, 1998; Bell & Jackson, 2001b). Bacteria besitzen ebenfalls nur eine RNA-Polymerase, jedoch besteht diese aus nur vier Untereinheiten, deren Spezifität für bestimmte Promotoren durch die Assoziation mit bestimmten σ -Faktoren bestimmt wird (Eick *et al.*, 1994; Busby & Ebright, 1994).

Für die Initiation der Transkription benötigt die aRNAP zusätzliche Faktoren: ein TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und den Transkriptionsfaktor B (TFB) (Hausner & Thomm, 1993; Bell & Jackson, 2001). Diese sind zu den eukaryotischen Faktoren TBP und TFIIB homolog und in Assoziation mit der aRNAP *in vitro* ausreichend, die basale Transkription zu initiieren (Hausner *et al.*, 1996; Hethke *et al.*, 1996; Qureshi *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1998).

Etwa 24-28 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstarts besitzen archaeale Promotoren eine konservierte, AT-reiche Sequenz, die der eukaryotischen TATA-Box sehr ähnlich ist. Dieser konservierte Bereich besitzt die Konsensussequenz 5'-YTTAWG-3' (Y = T/C; W = A/T) und wird oftmals als Box A bezeichnet und von TBP erkannt und gebunden (Reiter *et al.*, 1990; Hausner *et al.*, 1991; Hain *et al.*, 1992; Palmer & Daniels, 1995; Danner & Soppa, 1996; Thomm, 1996; Soppa & Link, 1997). Das purinreiche BRE (*transcription factor B recognition element*) ist ein zweites, für die Archaea typisches Promotorelement. Die archaeale Konsensussequenz lautet RnWAAWn (R = Purin, W = A/T, n = irgendein Nukleotid) und es ist stromaufwärts der TATA-Box lokalisiert (Lagrange *et al.*, 1998; Qureshi & Jackson, 1998; Bell *et al.*, 1999a; Soppa, 1999). Es wird von TFB gebunden und ist, wie bei hyperthermophilen Archaea gezeigt werden konnte, für die Transkriptionsrichtung und die Promotorstärke entscheidend (Lagrange *et al.*, 1998; Qureshi & Jackson, 1998; Bell *et al.*, 1999a, b). Die Sequenz des BRE bestimmt maßgeblich die basale Promotorstärke mit (Hofacker *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009). Das TATA-Box-Bindeprotein leitet die Transkriptionsinitiation ein, indem es in die kleine Furche der TATA-Box bindet, die DNA weitert und Knickstellen induziert was in einer stark aufgewundenen und gekrümmten DNA-Konformation resultiert (Rowlands *et al.*, 1994; Hausner *et al.*, 1996; Bell & Jackson, 1998; Littlefield *et al.*, 1999). Im nächsten Schritt bindet das TFB-Protein an die DNA. und interagiert dabei mit BRE und TBP/DNA-Komplex wobei ein stabiler ternärer Komplex ausgebildet wird (Qureshi & Jackson, 1998; Littlefield *et al.*, 1999). Durch die Bindung von TFB an den TBP/DNA-Komplex wird zu beiden Seiten der TATA-Box die Promotor-Region bedeckt (Hausner & Thomm, 2001). Sobald der ternäre Komplex ausgebildet ist, rekrutieren TFB und TBP die aRNAP an den Promotor (Abb. 2).

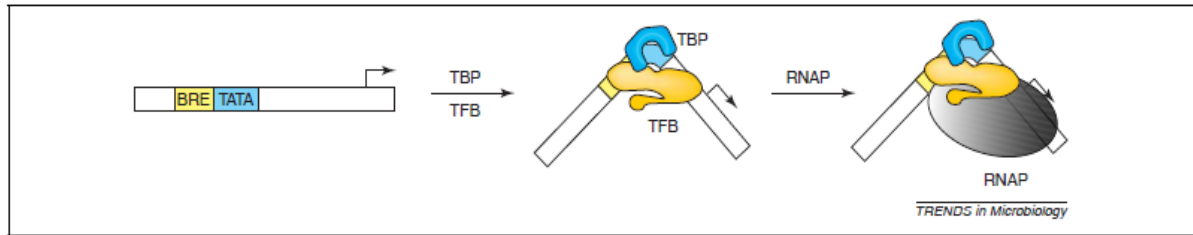


Abb. 2: Schematische Darstellung des von *in vitro* Studien abgeleiteten minimalen archaealen Transkriptionsinitiationskomplexes. Die generellen Transkriptionsfaktoren TBP und TFB binden kooperativ an die TATA-Box bzw. das BRE. Sobald gebunden, leiten diese Faktoren die Rekrutierung der RNA-Polymerase (RNAP) ein. Die Positionierung der Faktoren in diesem Schema basiert auf dem Model der homologen Faktoren TBP, TFIIB und RNAP II aus Hefen (siehe Chen & Hahn, 2004) (aus Bell, 2005).

Das archaeale TFB ist wie das eukaryotische Homolog TFIIB aus zwei verschiedenen Domänen aufgebaut: einer N-terminalen Zink-Finger-Domäne und einer C-terminalen Domäne. Die Zink-Finger-Region übernimmt dabei eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung der RNA-Polymerase (Buratowski & Zhou, 1993; Bell & Jackson 2000a). In der C-terminalen Domäne ist ein *Helix-turn-Helix*-Motiv lokalisiert, welches für die Bindung des TFB-Proteins an das BRE verantwortlich ist. Mutationen innerhalb des Motivs verhindern diese Bindung (Lagrange *et al.*, 1998; Littlefield *et al.*, 1999).

Als weiterer Transkriptionsfaktor konnte TFE identifiziert werden, der zu dem eukaryotischen TFIIE homolog ist, aber für die Initiation der Transkription *in vitro* nicht zwingend erforderlich ist. Vermutlich stabilisiert TFE die Promotorbindung des TBP unter suboptimalen Bedingungen, was *in vitro* eine bis zu dreifache Erhöhung der Transkriptionsrate bewirkt (Bell *et al.*, 2001a; Hanzelka *et al.*, 2001).

Die meisten Archaea besitzen nur ein *tbp*- und ein *tfb*-Gen. Das Vorkommen multipler *tbp*- und *tfb*-Gene sowie die temperaturabhängige Expression eines dieser TFB's wurde erstmals in dem halophilen Archaeon *Haloferax volcanii* beobachtet (Thompson *et al.*, 1999). Mittlerweile konnten für *Halobacterium salinarum* NRC-1, *Halobacterium salinarum* R1, *Halobacterium salinarum* PHH1, *Halobacterium salinarum* PHH4 und *Haloarcula marismortui* ebenfalls mehrere *tbp*- bzw. *tfb*-Gene nachgewiesen werden (Ng *et al.*, 2000; Baliga *et al.*, 2004; Pfeiffer *et al.*, 2008; Teufel *et al.*, 2008; Bleiholder *et al.*, 2011). Die Vielfalt der unterschiedlichen generellen Transkriptionsfaktoren (GTF) führt zu der Hypothese, dass sie durch Bildung verschiedener TBP-TFB-Komplexe eine Rolle bei der Transkriptionsregulation spielen (Baliga *et al.*, 2000; Facciotti *et al.*, 2007). Möglicherweise bilden die GTFs ein regulatorisches Netzwerk aus, welches z.B. die zelluläre Energieausnutzung unter limitierenden Bedingungen durch Genregulation optimiert (Facciotti *et al.*, 2010). Für das *tbpE*-Gen in *Halobacterium salinarum* PHH1 konnte bereits eine Sauerstoff- und für unterschiedliche *tfb*-Gene aus *Halobacterium*

salinarum NRC-1, PHH1 und PHH4 eine Temperaturabhängigkeit der Expression gezeigt werden (Teufel *et al.*, 2008; Bleiholder *et al.*, 2011).

Der basale archaeale Transkriptionsapparat erscheint als eine vereinfachte Version des komplexen eukaryotischen Systems (Bell & Jackson, 1998). Die archaealen Transkriptionsregulatoren zeigen jedoch in ihrer Struktur und Funktion eher eine Ähnlichkeit zu den bakteriellen Regulatorproteinen (Aravind & Koonin, 1999; Bell *et al.*, 1999b; Hochheimer *et al.*, 1999; Brinkmann *et al.*, 2000; Enoru-Eta *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2001). Wie bei den Bacteria erfolgt die negative Regulation der Transkription in Archaea nach simplen Prinzipien: Die archaealen Repressoren binden an DNA-Bereiche, die mit dem Promotor oder Transkriptionsstart überlagern und verhindern dadurch die Transkriptionsinitiation (Ouhammouch, 2004). Einige Beispiele für die negative Regulation der archaealen Transkription sind bereits gut untersucht: der Metall-abhängige Repressor 1 (MDR-1) aus *Archaeoglobus fulgidus* (Bell *et al.*, 1999b) und LrpA aus *Pyrococcus furiosus* (Brinkman *et al.*, 2000; Dahlke & Thomm, 2002) binden an Operatorsequenzen, die den Transkriptionsstart überlagern, wohingegen Lrs-14 aus *Sulfolobus solfataricus* (Bell & Jackson, 2000b; Fiorentino *et al.*, 2003) und TrmB aus *Thermococcus litoralis* (Lee *et al.*, 2003) an Sequenzen binden, die die BRE-TATA-Region überlagern. Das Ptr2-Protein aus *Methanocaldococcus janaschii* wirkt als Transkriptionsaktivator, indem es TBP zum Promotor rekrutiert (Ouhammouch & Geiduschek, 2001).

2.2 Halophile Archaea und Haloadaptation

Halophile (salzliebende) oder halotolerante Organismen existieren in allen drei Domänen des Lebens. Sie besiedeln hypersaline Umgebungen wie Salzseen, das Tote Meer oder Meersalzgewinnungsanlagen. In diesen Habitaten können Salzkonzentrationen im molaren Bereich bis zur Sättigung vorliegen. Die Eukaryoten sind überwiegend durch verschiedene Arten der Grünalge *Dunaliella* (Elevi Bardavid *et al.*, 2008) aber auch durch schwarze Hefen (Gunde-Cimerman, *et al.*, 2000; Petrovic *et al.*, 2002) vertreten. Halophile Bacteria sind unter den γ -Proteobakterien, den Cyanobakterien und einigen gram-positiven Bakterien zu finden. Mit wenigen Ausnahmen - wie z.B. *Ectothiorhodospira* und *Halorhodospira* - sind Bakterien überwiegend halotolerant und besiedeln Habitate mit niedrigen Salzkonzentrationen (Madigan & Oren, 1999).

In der Domäne der Archaea existieren in der Familie der Halobacteriaceae ausschließlich und bei den Methanogenen (*Methanohalobium*, *Methanohalophilus*) einige halophile Vertreter. Halophile Archaea benötigen zum Leben eine Salzkonzentration von mindestens 1,5 M und sind sogar in der Lage, in gesättigten Salzlösungen (5,2 M) zu

wachsen (Grant & Larsen, 1989). In Habitaten mit Salzkonzentrationen von über 2,5 M NaCl stellen sie die dominierende Population dar (Grant & Larsen, 1989). Die Familie der Halobacteriaceae ist phylogenetisch in die Ordnung der Halobacteriales eingeordnet, welche wiederum zum Phylum der Euryarchaeota zählt. Die Familie der Halobacteriaceae umfasst zurzeit 39 Gattungen (NCBI-Datenbank).

Aufgrund der Permeabilität von biologischen Membranen können Organismen die Wasseraktivität ihrer Zellen nicht höher halten, als die des umgebenden Mediums (Oren, 1999). Eine höhere Wasseraktivität innerhalb des Organismus würde andernfalls in einer hypersalinen Umgebung zu einem permanenten, starken Wasserverlust aus der Zelle in die Umgebung führen (Oren, 1999). Innerhalb der halophilen Mikroorganismen haben sich zwei unterschiedliche Überlebensstrategien durchgesetzt, durch welche diese Organismen den osmotischen Stress - bedingt durch das hypersaline Habitat - bewältigen können. Bei der *compatible solutes*-Strategie akkumulieren die Organismen kleine organische Moleküle (z.B. Betain, Glycin, Zucker, Zuckerderivate) im Zellinneren um das osmotische Gefälle zum Außenmedium auszugleichen. Somit bleibt die Salzkonzentration im Cytoplasma gering, eine Anpassung der intrazellulären Systeme an Hochsalzbedingungen ist nicht erforderlich (Oren, 1999). Diese *compatible solutes* werden entweder *de novo* synthetisiert oder falls vorhanden aus der Umgebung aufgenommen. Auch bei hohen intrazellulären Konzentrationen beeinträchtigen sie nicht die Enzymfunktionen (Brown, 1990).

Neben der *compatible solutes*-Strategie gibt es eine weitere Möglichkeit zur zellulären Anpassung an hypersaline Umgebungen: die sogenannte *salt-in*-Strategie. Die *salt-in*-Strategie findet bei zwei phylogenetisch nicht verwandten Gruppen Verwendung, den aeroben extrem halophilen Archaea der Ordnung Halobacteriales und den anaeroben halophilen Bakterien der Ordnung Haloanaerobiales (Oren, 1999). Bei dieser Strategie wird ein osmotisches Gleichgewicht zwischen Zellinnerem und Außenmedium durch Akkumulation von hohen intrazellulären Salzkonzentrationen hergestellt (Madigan & Oren, 1999; Oren, 1999). Dabei akkumulieren extrem halophile Archaea bis zu 4 M KCl und 1 M NaCl in der Zelle (Christian & Waltho, 1962). Im Gegensatz zum Außenmedium, welches überwiegend NaCl enthält, werden bei der *salt-in*-Strategie im Cytoplasma überwiegend K⁺- und Cl⁻-Ionen angereichert (Dennis & Shimmin, 1997). Der Vorzug von K⁺ zu Na⁺ ist wahrscheinlich in der Größe begründet. Na⁺ ist im Vergleich zu K⁺ kleiner und besitzt somit eine höhere Ladungsdichte. Somit bilden Na⁺-Ionen eine größere Hydrathülle und binden dementsprechend mehr umgebende Wassermoleküle als K⁺-Ionen (Dennis & Shimmin, 1997). Somit steht mehr freies Wasser für intrazelluläre Prozesse zur Verfügung.

Die hohe Salzkonzentration im Zellinneren erfordert eine Adaptation aller intrazellulären Systeme und struktureller Zellkomponenten an die vorherrschenden hohen Salzkonzentrationen (Oren, 1999). Im Laufe der Evolution haben sich die halophilen Proteine und Enzyme in ihrer Struktur und ihren Eigenschaften nicht nur an die hohen Salzkonzentrationen angepasst, sondern sie benötigen diese sogar für ihre Aktivität und Aufrechterhaltung ihrer Konformation (Marquez & Brodie, 1973; Kushner, 1985; Oren, 1999). Die Haloadaptation von Proteinen resultiert aus dem verstärkten Einbau saurer Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) auf der Oberfläche (Dym *et al.*, 1995; Frolow *et al.*, 1996; Pieper *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2002; Bieger *et al.*, 2003). Die Seitenketten von Glutaminsäure und Asparaginsäure sind bei physiologischem pH-Wert negativ geladen, daher sind sie stärker hydratisiert als andere Aminosäurereste. Dies ermöglicht den Proteinen die Bindung einer festen Hydrathülle, welche dem dehydratisierenden Effekt der Umgebung entgegenwirkt (Lanyi, 1974; Rao & Argos, 1981; Zaccai *et al.*, 1989; Eisenberg *et al.*, 1992; Frolow *et al.*, 1996). Der strukturelle Vergleich zwischen der Glukose-Dehydrogenase aus *Haloferax mediterranei* und dem nicht-halophilen Homolog zeigt, dass Größe und Anordnung der Hydrathülle des halophilen Enzyms signifikant größer ist (Britton *et al.*, 2006). Halophile Proteine besitzen eine geringe Anzahl an hydrophoben Aminosäuren (Lanyi, 1974; Rao & Argos 1981; Dennis & Shimmin, 1997; Oren, 1999). Das vermehrte Vorkommen von Aminosäuren mit sauren oder hydrophilen Seitenketten trägt ebenfalls zur Verringerung der Hydrophobizität bei und somit werden Protein-Aggregation (Aussalzen) oder struktureller Kollaps verhindert (Dennis & Shimmin, 1997).

Die Konformation der Proteine wird in ihrem Inneren weiterhin durch Salzbrücken stabilisiert, die von negativ geladenen Aminosäureresten mit den positiv geladenen basischen Aminosäureresten ausgebildet werden (Dym *et al.*, 1995). Es ist nicht nur die Stabilität der halophilen Enzyme sondern auch die Aktivität *in vitro* von einer NaCl- oder KCl-Konzentration von mindestens 2 M abhängig (Holmes *et al.*, 1997; Ebel *et al.*, 1999; Madern *et al.*, 2000). Bei Salzkonzentrationen unter 0,5-1 M kommt es meistens zu einer Entfaltung der halophilen Proteine (Wright *et al.*, 2002).

Halobakterien weisen in ihrem Erscheinungsbild ein breites Farbspektrum auf. Die charakteristische orange-rote Pigmentierung ist auf die Bildung von C₄₀- und C₅₀-Carotinoiden wie z.B. Lycopine und Bakterioruberine zurückzuführen, die den Zellen als Schutz vor photooxidativen Schäden durch zu starke Sonneneinstrahlung dient (Grant & Larsen, 1989). Violetttöne sind auf das Vorhandensein der Purpurmembran zurückzuführen, welche *Halobacterium salinarum* bei limitiertem oder limitierendem Sauerstoffpartialdruck ausbildet. Die Bacteriorhodopsine spielen eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel, da sie als lichtgetriebene Protonenpumpen agieren und dadurch einen Protonengradienten über der Membran aufbauen können, welcher zur ATP-

Generierung genutzt werden kann (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971 und 1973; Henderson *et al.*, 1990). Einige Halobakterien sind zur Bildung von Gasvesikeln befähigt, was durch eine weißlich-rosa, opaque Erscheinungsform zu erkennen ist. Mit steigender Salzkonzentration nimmt die Löslichkeit von Sauerstoff ab. Mit Hilfe der Gasvesikel können die Halobakterien ihre Zelldichte und somit die Schwebhöhe in den Gewässern verringern, um an die Licht- und Sauerstoffreiche Gewässeroberfläche zu gelangen.

2.3 Gasvesikel

Gasvesikel sind spezielle Hohlkörper, die intrazellulär fast ausschließlich von aquatisch lebenden Mikroorganismen gebildet werden (Walsby, 1994). Zur Gasvesikelbildung sind eine Reihe von Archaea – darunter einigen halophilen Arten – und bestimmte Bakterien befähigt. Insgesamt konnten Gasvesikel in über 150 Spezies von Prokaryoten gefunden werden (Walsby, 1981a, b). Darunter befinden sich neben halophilen Archaea (Larsen *et al.*, 1967) auch methanogenen Archaea (Archer & King, 1984) und viele Arten von Cyanobakterien (Walsby, 1981a). Unter den halophilen Archaea gehören *Halobacterium salinarum*, *Haloferax mediterranei*, *Halorubrum vacuolata* und *Haloquadratum walsbyi* (früher: *Natronobacterium vacuolatum*) zu den gasvesikelbildenden Spezies (Stoeckenius & Kunau, 1968; Englert *et al.*, 1990; Mwatha & Grant, 1993; Pfeifer *et al.*, 1997).

Gasvesikel sind gasgefüllte Hohlkörper, die nur aus Proteinen aufgebaut sind, Lipide und Kohlenhydrate fehlen gänzlich (Krantz & Ballou, 1973). Die Gasvesikelhülle ist frei permeabel für Gase, eine selektive Anreicherung bestimmter Gase erfolgt jedoch nicht (Walsby, 1969; Walsby & Hayes, 1989). Auf der äußeren, dem Cytoplasma zugewandten Oberfläche sind überwiegend hydrophile Aminosäuren lokalisiert, wohingegen an der dem Gasraum zugewandten Oberfläche hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren zu finden sind (Walsby, 1972; Walsby & Hayes, 1989). Durch diese Anordnung entsteht der wasserabstoßende Charakter der Gasvesikelwand. Die Gasvesikel ermöglichen der Zelle in der aquatischen Umgebung eine Form der passiven Bewegung in der Vertikalen in der Wassersäule. Durch den Auftrieb können die Zellen in der wässrigen Umgebung zur Oberfläche gelangen, wo mehr Licht und höhere Sauerstoffkonzentrationen vorhanden sind (Walsby, 1994). Des Weiteren besitzen Gasvesikel stark lichtbrechende Eigenschaften und können wahrscheinlich somit die Zellen vor photooxidativen Schäden schützen (Shear & Walsby, 1975). Durch die stark lichtbrechende Eigenschaft sind die Gasvesikel im Phasenkontrastmikroskop als hell-leuchtende Bereiche im Zellinneren zu erkennen. Desweiteren lässt diese Eigenschaft Gasvesikel-bildende (Vac^+) halobakterielle Stämme auf Festmedium als hellrosa, opaque Kolonien erscheinen. In allen untersuchten Organismen zeigen die Gasvesikel ähnliche Morphologien und werden hauptsächlich von einem Protein (GvpA) aufgebaut, unterscheiden sich jedoch in ihrer Größe (Walsby,

1994). Halobakterielle Gasvesikel haben einen Durchmesser von etwa 200 nm und können zylindrisch (Länge: 300 – 1500 nm) oder zitronenförmig (Länge: 250 nm) sein (Stoeckenius & Kunau, 1968; Simon, 1981; Englert *et al.*, 1990). Unter dem Elektronenmikroskop zeigt sich eine charakteristische Rippenstruktur, wobei die Rippen senkrecht zur Zylinderachse angeordnet sind (Jost, 1965; Stoeckenius & Kunau, 1968; McMaster *et al.*, 1996). Das Hauptstrukturprotein der Gasvesikelhülle ist das 7 bis 8 kDa große, stark hydrophobe GvpA-Protein (*gas vesicle protein*), welches etwa 95% des gesamten Proteingehalts der Gasvesikel ausmacht. Die Aminosäuresequenz des GvpA-Proteins ist zwischen den Haloarchaea *Halobacterium salinarum* und *Haloferax mediterranei* mit einer Sequenzähnlichkeit von 94% extrem stark konserviert (Englert *et al.*, 1990; Englert *et al.*, 1992a). Das 20 bis 42 kDa große hydrophile GvpC-Protein ist ein weiteres Gasvesikel-Strukturprotein, welches sich an der äußeren Oberfläche der Gasvesikel-Hülle befindet (Kinsman *et al.*, 1995). GvpC ist bei Halobakterien maßgeblich an die Formgebung der Gasvesikel beteiligt (Englert & Pfeifer, 1993; Offner *et al.*, 1996; Best, 2000). GvpC-negative Mutanten (ΔC) bilden unregelmäßig geformte Gasvesikel mit unterschiedlichen Durchmessern (Offner *et al.*, 1996). Durch Komplementation mit GvpC werden wieder Gasvesikeln mit definierter Form und definiertem Durchmesser gebildet (Offner *et al.*, 1996). Die GvpC-Proteine weisen mehrere interne Aminosäure-Sequenzwiederholungen auf, mit denen wahrscheinlich mehrere GvpA-Rippen klammerartig miteinander vernetzen werden (Walsby, 1994).

An der Gasvesikelsynthese in Haloarchaea sind insgesamt 14 verschiedene *gvp*-Gene (*gas vesicle protein coding genes*) beteiligt. Die für die Gasvesikelproteine kodierenden Genregionen werden in der Arbeitsgruppe Pfeifer als Modellsystem für die Untersuchung der Genregulation in Haloarchaea verwendet. Diese sind dafür geeignet, da sie sowohl aktiviert als auch reprimiert werden können (Englert *et al.*, 1992b; Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998). Die Bildung der Gasvesikel wird außerdem von Faktoren wie der Lichtintensität, Salzkonzentration oder der Verfügbarkeit von Sauerstoff beeinflusst und wird sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Ebene der Translation reguliert (Pfeifer *et al.*, 2002).

2.4 *Haloferax volcanii*: ein halophiler Modellorganismus zum Studium von haloarchaealen Genfunktionen und Proteinen

Zur funktionellen Charakterisierung halophiler Gene stehen zahlreiche *shuttle*-Vektoren zur Verfügung, die sowohl für *Haloferax volcanii* als auch für *Escherichia coli* einen Replikationsursprung besitzen (Lam & Doolittle, 1989; Holmes *et al.*, 1991; Pfeifer *et al.*, 1994; Danner & Soppa, 1996). Durch die Entwicklung eines effizienten Transformationssystems für Halobakterien (Cline & Doolittle, 1987; Cline *et al.*, 1989;

Blaseio & Pfeifer, 1990) wurde die Analyse von halophilen Genen erleichtert. Die funktionelle Charakterisierung der einzelnen an der Gasvesikelsynthese beteiligten *gvp*-Gene und deren Regulation erfolgt durch Transformationsstudien. Als Rezipient für die Transformationsexperimente wird meist *Haloferax volcanii* verwendet, der selbst keine Gasvesikel-kodierende Genregionen besitzt und somit einen sauberen genetischen Hintergrund bietet. Zudem besitzt *Haloferax volcanii* mit 4 bis 6 Stunden eine relativ kurze Generationszeit und ist relativ unproblematisch genetisch zu manipulieren. Des Weiteren ist die komplette Genomsequenz des Organismus bekannt (Genom Bioinformatics Group of UC Santa Cruz unter <http://archaea.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=haloVolc1> und *H. volcanii* Genome Website <http://zdna2.umbi.umd.edu/~haloweb/hvo.html>). Für diesen Organismus stehen weiterhin eine Reihe von gentechnischen Methoden zur chromosomalen Mutation zur Verfügung (Bitan-Banin *et al.*, 2003). Zudem wurden Transkriptom- und Proteom-Analysen etabliert und publiziert (Zaigler *et al.*, 2003; Karadzic & Maupin-Furlow, 2005; Lange *et al.*, 2007). Mit Plasmiden, die verschiedene Replikationsursprünge und Resistenzgene tragen, ist es möglich *Haloferax volcanii* mit zwei verschiedenen Plasmidkonstrukten gleichzeitig zu transformieren (Cline & Doolittle, 1987; Lam & Doolittle, 1989; Blaseio & Pfeifer, 1990; Holmes & Dyll-Smith, 1990; Pfeifer *et al.*, 1994). Mit Hilfe des Expressionsvektors pJAS35 können Leserahmen unter Kontrolle des Ferredoxin-Promotors (P_{fdx}) von *Halobacterium salinarum* exprimiert werden (Pfeifer *et al.*, 1994). Mit pWL102 (Lam & Doolittle, 1989) steht dagegen ein Vektor zur Verfügung, mit dem die *gvp*-Gene unter ihrer natürlichen Promotorkontrolle exprimiert werden können. Für die Analyse der basalen und induzierten Aktivität verschiedener haloarchaealer Promotoren steht mit dem *bgaH*-Leserahmen ein Reportergen zur Verfügung, das aus einer „superblauen“ Mutante des halophilen Archaeons *Haloferax lucentense* isoliert wurde und für ein Enzym mit β -Galaktosidase-Aktivität kodiert (Holmes *et al.*, 1997; Holmes & Dyll-Smith, 2000; Patenge *et al.*, 2000; Gregor & Pfeifer, 2001).

2.5 Gasvesikel-kodierende Genregionen bei Haloarchaea

An der Gasvesikelsynthese von halophilen Archaea sind 14 verschiedene Gene beteiligt, die in einer 9 kb großen vac-Region (*gas vacuole coding region*) lokalisiert sind und als *gvp*-Gene (*gas vesicle protein coding genes*) bezeichnet werden (Horne *et al.*, 1988; Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a).

Je nach Organismus sind eine oder zwei unterschiedliche vac-Regionen vorhanden, deren Produkte sich in Bezug auf Morphologie und Zeitpunkt der Synthese unterscheiden. Die 14 *gvp*-Gene der unterschiedlichen vac-Regionen von *Halobacterium salinarum* (p-vac

und c-vac) und *Haloferax mediterranei* (mc-vac) gliedern sich in die zwei entgegengesetzt orientierte Gengruppen *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* (Horne *et al.*, 1988; Horne *et al.*, 1991; Engler *et al.*, 1992a). *Halobacterium salinarum* PHH1 bildet mittels der p-vac-Region konstitutiv spindelförmige Gasvesikel (Horne & Pfeifer, 1989). Die c-vac-Region wird dagegen nur teilweise exprimiert, wobei kein c-*gvpACNO*-Transkript entsteht und daher auch keine cGvpA-basierten Gasvesikel gebildet werden können. *Halobacterium salinarum* PHH4 hat die p-vac-Region verloren und enthält nur die c-vac-Region (Horne *et al.*, 1988; Horne *et al.*, 1991). In diesem Organismus wird die gesamte c-vac-Region so exprimiert, dass es zur Bildung von zylinderförmigen Gasvesikeln in der stationären Wachstumsphase kommt (Horne & Pfeifer, 1989).

Das moderat halophile Archaeon *Haloferax mediterranei* besitzt eine chromosomal kodierte mc-vac-Region (*Haloferax mediterranei* *chromosomal*) (Englert *et al.*, 1992a), deren Expression ausschließlich unter Hochsalzbedingungen (> 17% NaCl) in der stationären Wachstumsphase zu zylinderförmigen Gasvesikeln führt (Rodriguez-Valera *et al.*, 1983; Englert *et al.*, 1990). Die Anordnung der *gvp*-Gene der mc-vac-Region ist mit der der c-vac- und p-vac-Region identisch und die einzelnen mc-*gvp*-Gene zeigen eine größere Verwandtschaft zu den Genen der p-vac- als zur c-vac-Region (Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a).

Die c-vac- und mc-vac-Region werden ausgehend von zwei Promotoren transkribiert, die vor dem *gvpD*- und dem *gvpA*-Gen entgegengesetzt zueinander lokalisiert sind. In der p-vac-Region sind zwei zusätzliche Promotoren vor den Genen *gvpF* und *gvpO* vorhanden (Abb. 3) (Horne & Pfeifer, 1989; Offner & Pfeifer, 1995; Krüger & Pfeifer, 1996; Offner *et al.*, 1996).

Halobacterium salinarum PHH1, p-vac-Region

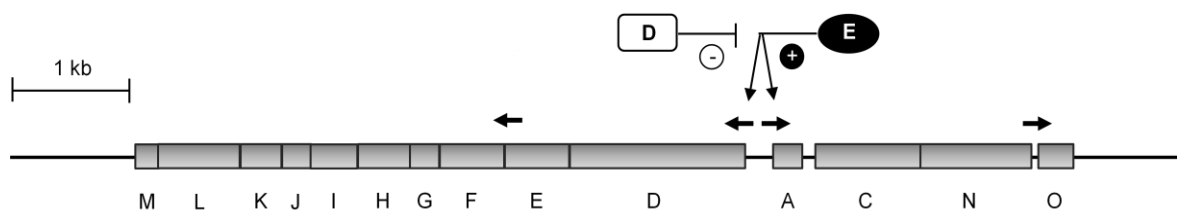


Abb. 3: Schematische Darstellung der auf dem Plasmid pHH1 lokalisierten Gasvesikel-kodierenden Region von *Halobacterium salinarum* PHH1 (p-vac). Die 14 *gvp*-Gene sind als Rechtecke dargestellt, die Buchstaben darunter geben die jeweiligen Gene an. Die dicken Pfeile geben die Lage und Transkriptionsrichtung der Promotoren an. Die grauen Pfeile geben die Länge der unterschiedlichen Transkripte an. Die beiden regulatorischen Proteine GvpE (Aktivator des P_A - und P_D -Promotors, mit „+“ gekennzeichnet) und GvpD (an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt, mit „-“ gekennzeichnet) sind schematisch dargestellt.

Die Funktionen der einzelnen Genprodukte der vac-Region bei der Gasvesikelsynthese sind bislang nur teilweise geklärt. Bekannt ist jedoch, dass nur acht der vierzehn *gvp*-Gene für die Bildung einer gasgefüllten Proteinstruktur notwendig sind (Offner *et al.*, 2000). Die beiden Proteine GvpD und GvpE sind an der Regulation der Gasvesikelbildung beteiligt (Abb. 3) (Englert *et al.*, 1992b; Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998), wobei es sich bei GvpE um einen Transkriptionsaktivator handelt (Krüger & Pfeifer 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Gregor & Pfeifer, 2001; Hofacker *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2008) und GvpD an der Repression der Gasvesikelsynthese beteiligt ist (Englert *et al.*, 1992b; Pfeifer *et al.*, 1994; Zimmermann & Pfeifer, 2003; Hofacker *et al.*, 2004). Für das GvpO-Protein wird eine duale Funktion vermutet: Zum einen scheint es an der Transkriptionsregulation des *gvpACNO*-Genclusters beteiligt zu sein (Offner *et al.*, 1996) und zum anderen handelt es sich womöglich auch um eine strukturgebende Komponente der Gasvesikel (Chu *et al.*, 2011). Die hydrophoben Proteine GvpJ und GvpM zeigen eine strukturelle und sequenzielle Ähnlichkeit zu GvpA und könnten im frühen Stadium der Gasvesikelsynthese eine wichtige Rolle spielen (Englert *et al.*, 1992a). Die Aminosäuresequenz von GvpG und GvpK weist ein hydrophoben N- und ein hydrophilen C-Terminus auf und für beide Proteine wird vermutet, dass sie entweder eine strukturgebende Komponente darstellen oder als Chaperone die Löslichkeit der hydrophoben Gasvesikelstrukturproteine ermöglichen (Englert *et al.*, 1992a).

2.6 Der Transkriptionsaktivator GvpE

Das GvpE-Protein stellt ein Transkriptionsaktivator für alle P_A - und P_D -Promotoren der vac-Regionen aus *Halobacterium salinarum* (c-, p-vac) und *Haloferax mediterranei* (mc-vac), mit Ausnahme von P_{CD} , dar (Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998; Zimmermann & Pfeifer, 2003; Hofacker *et al.*, 2004; Gregor & Pfeifer, 2005; Bauer *et al.*, 2008). Viele der archaealen Transkriptions-Regulatoren weisen ein typisch bakterielles *helix-loop-helix*-Motiv auf, das ein DNA-Bindemotiv bakterieller Regulatoren darstellt (Pabo & Sauer, 1992; Aravind & Koonin, 1999). Für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der GvpE-Proteine aller drei vac-Regionen werden sechs Bereiche vorhergesagt, die α -helikale Strukturen ausbilden könnten (Abb. 4) (Krüger *et al.*, 1998). Des Weiteren weisen die C-terminalen Bereiche Sequenzen auf, die aus basischen Leucinzipper-Motiven (bZIP-Motiven) in eukaryotischen Transkriptionsfaktoren bekannt sind (Hu *et al.*, 1990): eine Leucin-reiche Region und ein N-terminal dazu lokalisiertes Cluster basischer Aminosäuren (Abb. 4) (Krüger *et al.*, 1998). Die Ansammlung von basischen Aminosäuren in cGvpE mit der Sequenz 143-KRKVYR-148 (basische Aminosäuren sind unterstrichen) vor der amphiphilen α -Helix 6 (AH6) könnte das für bZIP-Proteine charakteristische DNA-Bindemotiv (DNAB) darstellen (Krüger *et al.*, 1998).

Dimerisierung des GvpE-Proteins in Lösung konnte bereits gezeigt werden (Plöber & Pfeifer, 2002). Desweiteren konnte eine Beteiligung von drei der vier Schlüsselamino­säuren des bZIP-Motivs an der Aktivatorfunktion von cGvpE ermittelt werden (Plöber & Pfeifer, 2002).

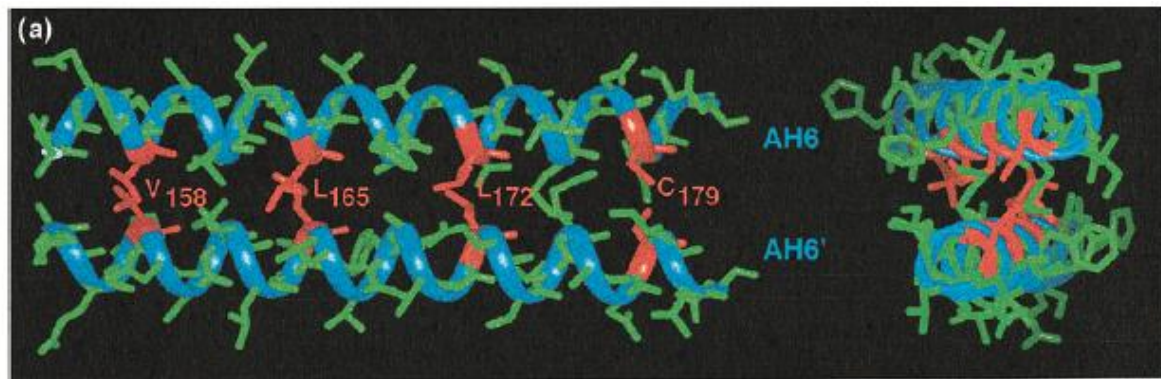


Abb. 5: *Molecular modelling* des C-terminalen Bereichs von cGvpE. Modell der Leucizipper-Region (Q153 bis N183) mit zwei parallel angeordneten AH6-Helices (AH6, AH6') im putativen cGvpE-Dimer. Die hydrophoben Kernamino­säuren des putativen Leucizipper-Motivs sind in rot dargestellt. Rechts ist die *coiled-coil*-Struktur aus axialer Sicht mit der Lokalisierung der hydrophoben Aminosäuren in der Kontaktfläche der beiden Helices zu sehen (nach Krüger *et al.*, 1998).

Neben der putativen DNAB zeigt auch die amphiphile α -Helix 4 (AH4) ein charakteristisches DNA-Bindemotiv mit basischen Aminosäuren der Sequenz 104-Kx₆RR-112 (basische Aminosäuren sind unterstrichen; x = beliebige Aminosäure). cGvpE-Proteine mit Mutationen in der Aminosäure K104 sind *in vivo* nicht mehr in der Lage als Transkriptionsaktivator zu fungieren (Plöber & Pfeifer, 2002).

2.7 Regulation der Gasvesikelbildung

Die Regulation der Gasvesikelbildung erfolgt mindestens durch die beiden Regulatorproteine GvpD und GvpE. Die durch GvpD vermittelte Repression führt zu einer Abnahme der durch GvpE-induzierten Promotoraktivität (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Aus Interaktionsstudien mit den beiden Regulatorproteinen GvpD und GvpE ist bekannt, dass GvpD und GvpE *in vitro* miteinander interagieren (Scheuch, 2003; Zimmermann & Pfeifer, 2003; Scheuch & Pfeifer, 2007). Auf welche Weise GvpD die Gasvesikel-Synthese reprimiert ist nicht bekannt, aber vorliegende Daten lassen vermuten, dass GvpD durch eine Protein-Protein-Interaktion mit GvpE dessen Stabilität oder Funktion beeinflusst was zur Abnahme der GvpE-Menge führt.

Das GvpE-Protein stimuliert die Transkriptionsrate der *gvp*-Promotoren P_A und P_D der p-vac- und mc-vac-Region und des P_A -Promotors der c-vac-Region, wobei für die Aktivierung keine weiteren Gvp-Proteine notwendig sind (Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998; Zimmermann & Pfeifer, 2003; Hofacker *et al.*, 2004; Gregor & Pfeifer, 2005; Bauer *et al.*, 2008). Die direkte Bindung des GvpE-Proteins an die DNA konnte bislang noch nicht gezeigt werden. Allerdings konnten durch Analysen an den drei P_A -Promotoren, die basal nur eine schwache oder keine Aktivität aufweisen, eine Stimulation der Transkription durch das jeweils homologe GvpE-Protein gezeigt werden (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Gregor & Pfeifer, 2001; Plöber & Pfeifer, 2002; Hofacker *et al.*, 2004). Der P_{pA} -Promotor kann von allen drei GvpE-Proteinen cGvpE, pGvpE und mcGvpE aktiviert werden, wobei cGvpE die stärkste Aktivierung hervorruft (Gregor & Pfeifer, 2001). P_{pD} kann ebenfalls von allen drei GvpE-Proteinen aktiviert werden, wobei wiederum cGvpE die stärkste Transkriptionsaktivierung hervorruft (Bauer *et al.*, 2008). Von den Promotoren P_{pA} , P_{pD} , P_{pF} und P_{pO} der p-vac-Region zeigen nur der P_{pA} - und der P_{pD} -Promotor eine Aktivierbarkeit durch GvpE (Hofacker *et al.*, 2004).

Die beiden Promotoren P_A und P_D sind entgegengesetzt orientiert und ihre jeweiligen BR-Elemente (BRE) sind in der p-vac- und mc-vac-Region durch eine 35 Nukleotide lange Region voneinander separiert. In der c-vac-Region ist dieser intergene Bereich aufgrund einer Insertion 21 nt länger. Mit Hilfe einer *scanning* Mutagenese dieses Bereichs der mc-vac-Region konnte die Sequenz TGAAACGG-n4-TGAACCAA in unmittelbarer Nähe des BRE als notwendig für die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{mcA} identifiziert werden. *In silico* Analysen der intergenen Bereiche der c-vac-, p-vac- und mc-vac-Region zeigen drei konservierte DNA-Abschnitte mit einer Länge von mindestens vier Nukleotiden. Zwei dieser Abschnitte liegen exakt in den für die GvpE-Wechselwirkung als notwendig nachgewiesenen DNA-Bereichen des P_{mcA} -Promotors. Der dritte konservierte Bereich liegt in unmittelbarer Nähe zu den BRE der P_D -Promotoren (Gregor & Pfeifer, 2005). Hofacker *et al.* konnte zuvor bereits eine Beteiligung der Sequenz AACCA stromauf des BRE von P_{pA} an der GvpE-Aktivierung dieses Promotors zeigen (Hofacker *et al.*, 2004). Weitere *scanning* Mutagenesen des intergenen Bereichs der p-vac-Region bestätigen die Beteiligung von jeweils einer 20 Nukleotiden langen Sequenz an der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} . Die tatsächliche Lokalisation dieser Sequenzen deckt sich mit der durch die *in silico* Analysen vorhergesagten Lokalisation: Der jeweils erste 8 Nukleotide lange Bereich grenzt bis auf ein Nukleotid an das BR-Element und ist von vier Nukleotiden (für die Aktivierung durch GvpE nicht notwendig) von dem zweiten stromaufwärts liegenden 8 Nukleotide langen Bereich getrennt (Abb. 6) (Bauer *et al.*, 2008). Da P_{pA} und P_{pD} nur durch 35 Nukleotide von einander separiert sind, überlappen sich die jeweils distalen Elemente im Zentrum der intergenen Region fast vollständig (Abb. 6). Die Ergebnisse der verschiedenen Analysen lassen darauf schließen, dass es

sich bei diesen Sequenzen um „*upstream activator sequences*“ (UAS) handelt, die für die GvpE-vermittelte Aktivierung benötigt werden (Gregor & Pfeifer, 2005; Bauer *et al.*, 2008).

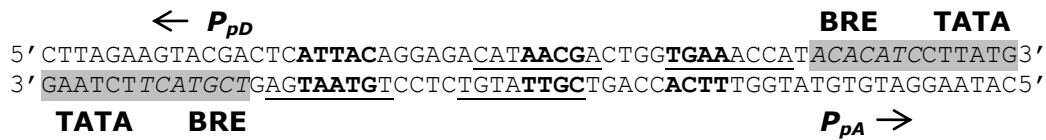


Abb. 6: Doppelsträngige Sequenz der P_{pD} - P_{pA} -Promotorregion. Die TATA-Boxen (kursiv) und BR-Elemente der Promotoren sind grau hinterlegt. Nukleotide (≥ 4), die in allen drei c-, p- und mc-vac-Sequenzen konserviert sind, sind fett gedruckt. Die proximalen und distalen Elemente der beiden GvpE-UAS sind unterstrichen. Pfeile markieren die Transkriptionsrichtung der beiden gegenläufig orientierten Promotoren P_{pD} und P_{pA} .

Unter Nutzung eines dualen P_{pA} - P_{pD} -Promotorkonstruktes konnte gezeigt werden, dass beide P_{pA} - und P_{pD} -GvpE-UAS simultan funktional sind und für die zeitgleiche GvpE-vermittelte Promotoraktivierung beider Promotoren notwendig sind (Marschhaus, 2007; Bauer *et al.*, 2008). Mutationen im Zentrum der intergenen Region beeinträchtigen die GvpE-Induzierung beider Promotoren P_{pA} und P_{pD} am stärksten. Somit scheint das jeweils distale Element der beiden GvpE-UAS im dualen Promotorkonstrukt für die GvpE-Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} das wichtigere zu sein (Bauer *et al.*, 2008). Untersuchungen an der P_{pA} -Promotorregion in einem P_{pA} -Einzelpromotorkonstrukt zeigten allerdings, dass die beiden 8 nt langen Elemente der GvpE-UAS dieses Promotors in ihrer Funktion für die GvpE-vermittelte Promotoraktivierung nicht identisch sind (Marschhaus, 2007; Bauer *et al.*, 2008). Während im dualen Promotorkonstrukt die distalen Elemente für die GvpE-vermittelte Aktivierung wichtiger sind als die proximalen, ist das distale Element für die Aktivierung von P_{pA} im P_{pA} -Einzelpromotorkonstrukt nicht notwendig. Dagegen führt die Substitution des proximalen P_{pA} -GvpE-UAS-Elements mit einer *nonsense* Sequenz zu einem vollständigen Verlust der Aktivierbarkeit dieses Promotors durch GvpE (Marschhaus, 2007; Bauer *et al.*, 2008). Die GvpE-UAS-Elemente sind jeweils nur ein Nukleotid von den BRE der Promotoren entfernt, Variationen dieses Abstands führen ebenfalls wie die oben beschriebene Substitution des proximalen Elements mit einer *nonsense* Sequenz zu einem Verlust der GvpE-vermittelten Aktivierung. Dies zeigt, dass sich GvpE-UAS und BRE in engem Kontakt für eine funktionelle GvpE-Aktivierung befinden muss (Bauer *et al.*, 2008). Aufgrund der räumlichen Nähe von BRE und GvpE-UAS ergibt sich die Frage, ob GvpE mit dem basalen Transkriptionsapparat wechselwirkt. Für cGvpE und pGvpE konnte bereits *in vitro* eine Interaktion mit den fünf verschiedenen TATA-Box bindenden Proteinen TbpA bis TbpE aus *Halobacterium salinarum* nachgewiesen werden

(Teufel & Pfeifer, 2010). In weiteren Studien wurde die Interaktion von cGvpE mit den Transkriptionsfaktoren TfbB, TfbC, TfbD, TfbF und TfbG aus *Halobacterium salinarum* NRC-1 *in vitro* nachgewiesen (Bleiholder *et al.*, 2011). Möglicherweise erleichtert die Interaktion zwischen GvpE und den generellen Transkriptionsfaktoren (GTF's) die Bindung dieser Faktoren an den Promotor was so zu einer verstärkten Rekrutierung des basalen Transkriptionsapparates an den *gvp*-Promotoren führt (Teufel & Pfeifer, 2010; Bleiholder *et al.*, 2011).

2.8 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte näher untersucht werden, auf welche Weise die GvpE-vermittelte Promotoraktivierung der Promotoren P_{pD} und P_{pA} auf molekularer Ebene erfolgt. Aufgrund der divergenten Ergebnisse für die Wichtigkeit des Zentrums der intergenen Region (und damit des distalen GvpE-UAS-Elements) für die GvpE-vermittelte P_{pA} -Aktivierung im dualen P_{pD} - P_{pA} - und P_{pA} -Einzel-Promotorkonstrukt sollte analog zu den Experimenten im P_{pA} -Einzel-Promotorkonstrukt eine Substitutionsmutagenese der GvpE-UAS von P_{pA} im dualen P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukt erfolgen. Das distale P_{pA} -GvpE-UAS-Element sollte durch Substitution mit einer *nonsense* Sequenz bzw. das proximale P_{pA} -GvpE-UAS-Element durch Substitution mit der Sequenz des distalen oder mit einer *nonsense* Sequenz verändert werden, um die Wichtigkeit der beiden Elementflanken bei Anwesenheit einer funktionalen P_{pA} -Promotorregion zu definieren. Durch Verwendung eines dualen Promotorkonstrukts sollte ein möglicher Einfluss der Modifikationen auf die GvpE-vermittelte Aktivierung beider Promotoren P_{pA} und P_{pD} untersucht werden. Zur näheren Charakterisierung der Funktion der beiden P_{pD} -GvpE-UAS-Elemente sollte ebenfalls eine Substitutions-Mutagenese dieser Region - vergleichend in einem P_{pD} -Einzel- und dualen P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukt - durchgeführt werden.

Zusätzlich sollten in der P_{pD} -Promotorregion weitere Bereiche identifizieren werden, die neben putativer GvpE-Bindestelle, BRE und TATA-Box für die basale und GvpE-induzierte Aktivität dieses Promotors von Bedeutung sind. Hierfür sollte die DNA-Sequenzen der P_{pD} -Promotorregion in einem 50 bp langen Bereich stromauf des Transkriptionsstarts der *p-gvpD*-mRNA in einer 4 bp *scanning* Mutagenese gezielt modifiziert und eventuelle Aktivitätsänderungen im Vergleich zum Wildtyp mit Hilfe des *bgaH*-Leserahmens ermittelt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war den Einfluss der Promotorelemente BRE und TATA-Box sowie der intergenen Region zwischen den Promotoren P_{pD} und P_{pA} auf die jeweilige Aktivität dieser beiden Promotoren zu bestimmen. Dafür sollten in einem dualen Promotorkonstrukt P_{pD} - P_{pA} -Chimären generiert werden, bei denen die entsprechenden

Elemente untereinander ausgetauscht werden sollten. Durch Verwendung von zwei unterschiedlichen Leserahmen sollte der Einfluss der jeweiligen Mutation auf beide Promotorchimären simultan analysiert werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte schließlich untersucht werden, ob die Interaktion zwischen GvpE und TFB für eine effiziente GvpE-vermittelte Promotoraktivierung erforderlich ist. Hierbei lag ein Schwerpunkt des Interesses auf der Identifizierung von Aminosäuren im GvpE-Protein, die an der Interaktion mit TFB beteiligt sind. Zur näheren Lokalisierung des Interaktionsbereichs von GvpE sollten verschiedenen GvpE-Mutanten, von denen einige infolge der eingeführten Mutationen ihre Aktivatorfunktion verloren haben, auf ihre Interaktionsfähigkeit mit TFB *in vitro* untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Hilfsmittel

Im Folgenden sind die verwendeten Chemikalien und Hilfsmittel sowie deren Hersteller aufgeführt. Hier nicht aufgelistete Chemikalien und Hilfsmittel wurden von den Firmen AppliChem, Boehringer Ingelheim, LS Labors, Merck, Roche Diagnostics, Roth, Sigma und Serva bezogen. Bestandteile für Nährmedien wurden von der Firma Bacto, Difco und Oxoid bezogen.

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid (30% w/v)/ Bisacrylamid (0,8% w/v)	Carl Roth & Co, Karlsruhe
Agarose BiozymeME Agarose	Biozym, Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth & Co, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth & Co, Karlsruhe
Bacto-Agar, -Trypton, -Hefeextrakt	Difco, Detroit
BioTrace™ Nitrozellulosemembran	Pall Gelman GmbH, Dreieich
Biodyne A Nylonmembran	Pall Gelman GmbH, Dreieich
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
BSA (Bovine Serum Albumin)	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue (G250, R250)	Serva, Heidelberg
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG DNA und RNA Labeling Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
	Carl Roth & Co, Karlsruhe
EDTA	LS Labor-Service GmbH, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth & Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
Filterpapier, Whatman	Machery & Nagel, Düren
Formaldehyd (37%)	LS Labor-Service GmbH, Darmstadt

Formamid	LS Labor-Service GmbH, Darmstadt
Guanidiniumthiocyanat (GTC)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences, UK
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isopropanol	LS Labor-Service GmbH, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Lovastatin (Mevinolin-Derivat)	Geschenk von MSD Sharp & Dohme GmbH
Magnesiumsulfat Heptahydrat	LS Labor-Service GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumchlorid	LS Labor-Service GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	LS Labor-Service GmbH, Darmstadt
Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose)	Qiagen, Hilden
Novobiocin	Serva, Heidelberg
ONPG (ortho-Nitrophenylgalaktopyranosid)	Serva, Heidelberg
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma, St. Louis, USA
Random Hexamer Primer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Saccharose	Serva, Heidelberg
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
TEMED (N'N'N'N'-Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Wasser, Rotisolv® HPLC Gradient Grade	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

X-Gal

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

3.1.2 Enzyme und Kits

DIG DNA und RNA Labeling Kit

Roche Diagnostics, Mannheim

DIG Luminescent Detection Kit

Roche Diagnostics, Mannheim

E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I

Omega Bio-Tek Inc., Norcross, USA

GenElute™ PCR Cleanup Kit

Sigma, St. Louis, USA

QIAEX II Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

Quiaprep® Spin Miniprep Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick® Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

DNaseI (1 U/μl, RNase-frei)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)

Invitrogen, UK

PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase,
(2,5 U/μl)

Stratagene

Pfu-DNA-Polymerase, (2,5 U/μl) #EP0579

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Power SYBR® Green PCR Mastermix

Applied Biosystems, GB

Restriktionsendonukleasen

MBI Fermentas, St. Leon-Rot;
New England Biolabs

RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

T4-DNA-Ligase (400 U/μl)

New England Biolabs

T4-Phosphonukleotidkinase, (10 U/μl)

New England Biolabs

3.1.3 Größenstandards

DNA

GeneRuler™ DNA Ladder Mix #SM0331

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Protein

Protein Molecular Weight Marker #SM0431

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

RNA

0,5-10 kb RNA-Ladder

Invitrogen, UK

3.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 1. Synthetische Oligonukleotide (Biomers), die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Oligonukleotidsequenz* (5'3')	Position
cE-D116A5'	GTTCGGCGCGG <u>CAG</u> TCAGCCCG	4117-4096 ^a
cE-D116A3'	CGGGCTGACT <u>GCC</u> CGCGCCGAAC	4096-4117 ^a
cE-Y123A5'	GGGCACGATG <u>GCA</u> CCACACCTC	4096-4075 ^a
cE-Y123A3'	GAGGTGTGGT <u>IGC</u> CATCGTGCCC	4075-4096 ^a
cE-Y146A5'	CGGAAGGTG <u>GCA</u> CGCGTCGCGG	4026-4005 ^a
cE-Y146A3'	CCGCGACGCGT <u>IGC</u> CACCTTCCG	4005-4026 ^a
cE-D150A5'	CGCGTCGCGG <u>CAG</u> CCCAAGCC	4014-3994 ^a
cE-D150A3'	GGCTTGGGCT <u>IGC</u> CGCGACGCG	3994-4014 ^a
pDMut1/5'	CGTTATGT <u>ACAG</u> TGTAATGAGTCGTA CTT CTAAG	53-20 ^b
pDMut2/5'	CGTTATGTCTC <u>GAT</u> CAATGAGTCGTA CTT CTAAG	53-20 ^b
pDMut3/5'	CGTTATGTCTCCTG <u>CTT</u> AGAGTCGTA CTT CTAAG	53-20 ^b
pDMut4/5'	CGTTATGTCTCCTGTAA <u>ATCAT</u> CGTA CTT CTAAG	53-20 ^b
pDMut5/3'	CTAAGAAGCTTTACACTCTC <u>TACC</u> CTTAGAAGTACGAC	11-7 ^c , 1-33 ^b
pDMut6/3'	CTAAGAAGCTTTACACT <u>TGTT</u> GTACTTAGAAGTACGAC	11-7 ^c , 1-33 ^b
pDMut7/3'	CTAAGAAGCTTTAC <u>GTAT</u> TCCGTA CTT AGAAGTACGAC	11-7 ^c , 1-33 ^b
pDMut8/3'	CTAAGAAGCTT <u>GCA</u> GCTCTCCGTA CTT AGAAGTACGAC	11-7 ^c , 1-33 ^b
pDMut9/3'	CTAAGAAGT <u>GAG</u> ACACTCTCCGTA CTT AGAAGTACGAC	11-7 ^c , 1-33 ^b
pDMut10/3'	CTAAG <u>GCT</u> TTTACACTCTCCGTA CTT AGAAGTACGAC	11-7 ^c , 1-33 ^b
pDMut11/3'	CT <u>CCAG</u> AGCTTTACACTCTCCGTA CTT AGAAGTACGAC	11-7 ^c , 1-33 ^b
pDMut12/3'	<u>TAC</u> AGAAGCTTTACACTCTCCGTA CTT AGAAGTACGAC	11-7 ^c , 1-33 ^b
3'pD1	ACTGGTGAAACCATAACATCCTTATG	54-80 ^b
pDMut5-12/5'	ATGGCGCAACCAGATT <u>CCATG</u>	125-145 ^b
5'pD1+1	CGTTATGTCTCC <u>CGTTATGT</u> GTCGTA CTT CTAAG	53-19 ^b
5'pD1delta2	CGTTATGTCTCC <u>GCTGATT</u> GTCGTA CTT CTAAG	53-19 ^b
5'pD2+2	GT <u>GTAA</u> TGACTCCTGTAATGAGTCG	55-29 ^b
5'pDdelta1+2	GT <u>GCTC</u> ACCCTCCTGTAATGAGTCG	55-29 ^b
3'pD2	TGGTGAAACCATAACATCCTTATG	56-80 ^b
pDpA(delta1)5'	GAGTCTACA <u>ACT</u> GGTGAAACCATAC	45-69 ^b
3'-pA2	TCCTGTAATGAGTCGTA CTT CTAAGTACG	44-16 ^b
3'PpA-bgaH/NcoI	CTTCTGCCAAGCC <u>CAT</u> GGAATCTGTTGCGCC	168-127 ^b
5'p-gvpD/XbaI	CAGCAAGTCGTTCTAGAT <u>TTAG</u> ACCATCTCCGTGAGCG	1710-1674 ^c
5'p-gvpD+UGA	CTAGCTCACCCGCC <u>CTGAGTGAATGA</u> CGGAATCGTGTTATTC	98-139 ^c
5'pA1+1delta2	GGCATAACGATACATCCTTATGTGATGC	57-86 ^b

pA1delta2(2)5'	GGG <u>CTGATT</u> TACACATCCTTATGTGATGC	57-86 ^b
3'pA1	AGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAGTCG	56-30 ^b
3'p-gvpD+UGA	GAATAACACGATTCCG <u>TCA</u> TTCACTCAGGGCGGGTGAGCTAG	139-98 ^c
5'pDpA-DBRE	GGTGAAACCATTCG <u>TACT</u> CTTATGTGATGC	57-86 ^b
3'-pA1	AGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAGTC	56-31 ^b
pApD-A-BRE5'	GTCTCCTGTAATGAGACACATCTCTAAGTACGGAGAG	47-11 ^b
pApD-A-BRE3'	CTCTCCGTACTTAGAGATGTGTCTCATTACAGGAGAC	11-47 ^b
pDpA-D-TATA5'	ATACACATCTCTAAGTGATGCCCCGAGTATAG	66-96 ^b
pDpA-D-BRE+TATA3'	GGTTTCACCAGTCGTTATGTCTCCTG	65-40 ^b
pApD-A-TATA5'	AGTCGTA <u>CTTATG</u> TACGGAGAGTGTAAGC	34-3 ^b
pApD-A-BRE+TATA3'	CATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAAAC	35-64 ^b
pDpA-D-BRE+TATA5'	AT <u>TCGTA</u> CTTCTAAGTGATGCCCCGAGTATAG	66-96 ^b
pApD-A-BRE+TATA5'	AGACACATCCTTATGTACGGAGAGTGTAAG	34-4 ^b
pApD-invert-rev5'	CAGTCGTTATGTCTCCTGTAATGAGACACATCCTTATGTGATG	43-85 ^b
pApD-invert-rev3'	GAGACATAACGACTGGTGAAACCATTCGTA <u>CTTCTA</u> AGTACGGAG	57-13 ^b
pDpA-inv(ABRE)5'	GAGTCGTA <u>CTTCT</u> ATGTGATGCCCG	65-89 ^b
pDpA-inv(A)3'	ATTACAGGAGACATAACGACTGGTGAAAC	36-64 ^b
pDpA-inv(DBRE)5'	CATACACATCTCTAAGTACGGAGAGTG	35-8 ^b
pDpA-inv(D)3'	GTTTCACCAGTCGTTATGTCTCCTG	64-40 ^b
pDpA-inv(ABR+TA)5'	GAGTCGTA <u>CTTCTA</u> AGTGATGCCCCGAGTATAG	65-96 ^b
pDpA-inv(DBR+TA)5'	CATACACATCCTTATGTACGGAGAGTGTAAG	35-4 ^b
5'DL-XbaI	GTGTAAGCTTCTAGAACAGTCGTGAAGCGAAG	11-7 ^b , 1-28 ^c
3' DL+D-BamHI	GTAGAGGGGATCCCTGTCTCGGTCCAAC	274-247 ^c
pE1 ¹	CGGAGATGGTGGA <u>TCCAT</u> GGACGACTTGC	1679-1708 ^c
pE2 ¹	GATCTTCTGTCTGCAGGTACCGTATGTGTATAGG	2309-2275 ^c
qpD5'65***	ATG AGTTCACCCAATCTAGCTCACCCGC	83-110 ^c
qpD3'65***	CCAGATCGAGTTTCTCGAATGGCACG	422-397 ^c
qpD(65)120,3'***	TGCACCGTTAATGAGGAGCGTTTCCC	202-177 ^c
qrpoB(Hfx)5'65***	ATG GCTCAGGCACAGCGAGAAGCG	1-24 ^d
qrpoB(Hfx)3'65***	CGTAGATGTCCTCTCTCCTCGGCGTC	340-312 ^d

* Kursiv gekennzeichnete Stellen markieren Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme. Start- bzw. Stopcodons sind fett dargestellt. Positionen mit Basenaustausch sind unterstrichen.

** synthetische Oligonukleotide für die qRT-PCR

^a Bindestellen innerhalb der c-vac-Sequenz (Genbank accession number X94688)

^b Bindestellen innerhalb der p-gvpACNO-Sequenz (Genbank accession number X64729)

^c Bindestellen innerhalb der p-gvpD-M-Sequenz (Genbank accession number X64729)

^d Bindestelle innerhalb der rpoB' Sequenz (Genbank accession number AB477170)

¹ Zur Verfügung gestellt von Dagmar Gregor

3.1.5 Verwendete Mikroorganismen

<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> M15	Qiagen, Hilden
<i>Escherichia coli</i> GM1674 dam ⁻	Palmer & Marinus, 1994
<i>Escherichia coli</i> TOP10F'	Invitrogen, USA

3.1.6 Verwendete Plasmidvektoren (Antibiotikaresistenzen)

pBlueskript II KS (+) (Ampicillin ^R)	Stratagene, La Jolla, USA
pBlueskript II SK (+) (Ampicillin ^R)	Stratagene, La Jolla, USA
pET28a+ (Kanamycin ^R)	Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt
pQE8 (Ampicillin ^R)	Qiagen, Hilden
pJAS35 (Ampicillin ^R , Novobiocin ^R)	Pfeifer <i>et al.</i> , 1994
pWL102 (Ampicillin ^R , Mevinolin ^R)	Lam & Doolittle, 1989

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Wachstumsbedingungen

Die Anzucht der unterschiedlichen *E. coli*-Stämme erfolgte aerob bei 37 °C in LB-Medium (Sambrook & Russel, 2001). Flüssigkulturen wurden bei 180 upm auf einem Schüttler inkubiert. Zur Selektion von Transformanten wurden dem Medium in Abhängigkeit der vorhandenen Resistenzgene 100 µg/ml Ampicillin und/oder 25 µg/ml Kanamycin zugegeben.

Haloferax volcanii WFD11 wurde in 3 M Vollmedium (VM) mit 21,6% Salz angezogen (3 M NaCl, 150 mM MgSO₄, 40 mM KCl, 10 mM McCl₂, 25 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,05% (w/v) CaCl₂, 0,5% (w/v) Trypton, 0,3% (w/v) Hefeextrakt) Flüssigkulturen wurden aerob bei 37 °C und 180 upm und Kulturen auf Festmedium in feuchter Atmosphäre bei 42 °C inkubiert. Um Transformanten zu selektieren, wurde dem Medium 0,2 µg/ml Novobiocin und/oder 6 µg/ml Mevinolin in Abhängigkeit der vorhandenen Resistenzgene zugegeben.

3.2.2 Wachstumskurven von *Hfx. volcanii* WFD11-Transformanten

Zellen von *Hfx. volcanii* WFD11 wurden wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben kultiviert. 50 ml Hauptkulturen wurden zu einer OD_{600nm} von 0,02 angeimpft und bei 37 °C und 180 upm für drei Tage inkubiert. Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurde die optische Dichte (OD_{600nm}) der Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Wachstums gemessen und die Werte dokumentiert. Den Kulturen wurde nach 54 h Wachstum Proben für den ONPG-Test und die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford

entnommen. Ebenfalls wurden Proben für eine spätere Isolierung der Gesamt-RNA, Gesamt-Proteine und Plasmide entnommen. Diese wurden bei 4°C und 5000 upm sedimentiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellsedimente bei -20 °C bis zur weiteren Aufbereitung aufbewahrt.

3.2.3 Transformation von *E. coli*

Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte durch Hitzeschock nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989). Der *E. coli*-Stamm TOP10F⁺ wurde verwendet um Plasmide zu amplifizieren, die anschließend für Sequenzierung, Restriktionsanalyse und Transformation von *E. coli*-Stamm GM1674 verwendet wurden. Der *E. coli*-Stamm GM1674 (Palmer & Marinus, 1994) wurde verwendet, um Plasmid-DNA ohne dam-Methylierung für die Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11 zu erhalten.

3.2.4 Konstrukt für die Transformation von *E. coli* M15

p-gvpH x pQE8 enthält ein 559 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment mit dem p-gvpH-Leserahmen aus *Halobacterium salinarum* PHH1 (Hofacker & Pfeifer, unveröffentlicht).

3.2.5 Konstrukt für die Transformation von *E. coli* BL-21(DE3)

tfbC x pET28a(+) enthält ein 951 bp *Nco*I-*Xho*I-Fragment mit dem *tfbC*-Leserahmen aus *Halobacterium salinarum* NRC-1 (Bleiholder, 2009).

3.2.6 Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11

Die Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11 erfolgte nach einem Protokoll von Pfeifer & Ghahraman (1993). *Hfx. volcanii* besitzt ein Restriktionssystem, welches methylierte DNA erkennt und fragmentiert. Eine Passage der Plasmid-DNA durch *E. coli* GM1674 vor der Transformation, umgeht diese Restriktionsbarriere und erhöht die Effizienz der DNA-Aufnahme (Holmes *et al.*, 1991). Das Vorhandensein der Plasmide in den Transformanten wurde mittels Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA und, falls erforderlich, durch Southern-Analyse kontrolliert.

3.2.7 Konstrukte für die Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11

Die synthetischen Oligonukleotide, die für die Herstellung verschiedener Plasmidkonstrukte verwendet wurden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

***gvp*-Leserahmen im Expressionsvektor pJAS35**

Die Expression eines Leserahmens ohne eigenen Promotor erfolgte unter Kontrolle des Ferredoxin-Promotors (P_{fdx}) im halobakterielle *shuttle*-Vektor pJAS35 (Pfeifer *et al.*, 1993; Pfeifer *et al.*, 1994). Als Selektionsgen trägt der pJAS35-Vektor das β -Lactamase-Gen für eine Ampicillin-Resistenz in *E. coli*-Transformanten und ein mutiertes GyraseB-Gen (*gyrB*) aus *Haloferax alicantei* (Holmes & Dyall-Smith, 1991; Holmes *et al.*, 1991).

cE WT enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens im Expressionsvektor pJAS35 (Plöber, 1998).

pE^{ex} enthält das 599 bp große *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *p-gvpE*-Leserahmens in pJAS35 (Gregor & Pfeifer, 2001).

Substituierte *c-gvpE*-Leserahmen im Expressionsvektor pJAS35

cE_{zip}C180L enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 538-539 in pJAS35. Die Substitution führte zu dem Aminosäureaustausch C180L in der Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{zip}C180D enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 538-539 in pJAS35. Die Substitution führte zu dem Aminosäureaustausch C180D in cGvpE (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{zip}L173E/C180L enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von je 2 Nukleotiden an Position 517-518 und 538-539 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu dem Aminosäureaustauschen L173E/C180L in cGvpE (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{zip}V159D enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 1 Nukleotid an Position 476 in pJAS35. Die Substitution führte zu dem Aminosäureaustausch V159D in cGvpE (Plöber, 2002).

cE_{zip}L166E enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 496-497 in pJAS35. Die Substitution führte zu dem Aminosäureaustausch L166E in cGvpE (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{AH4}AAA enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 3 Nukleotiden an Position 310-312 und je 2 Nukleotiden an Position 331-332 und 334-335 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu den Aminosäureaustauschen K104A/RR111,112AA in cGvpE (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{AH4}K104A/R112A enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 3 Nukleotiden an Position 310-312 und 2 Nukleotiden an Position 334-335 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu den Aminosäureaustauschen K104A/R112A in cGvpE (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{AH4}K104A enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 3 Nukleotiden an Position 310-312 in pJAS35. Die Substitution führte zu dem Aminosäureaustausch K104A in cGvpE (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{AH4}R111A/R112A enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von je 2 Nukleotiden an Position 331-332 und 334-335 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu den Aminosäureaustauschen RR111,112AA in cGvpE (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{AH4}R111A enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 331-332 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu den Aminosäureaustauschen R111A in der Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{AH4}R112A enthält das 624 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 334-335 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu den Aminosäureaustauschen R111A in der Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins (Plöber & Pfeifer, 2002).

cE_{D117A} enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 350-351 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu dem Aminosäureaustausch D117A in der Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins. Die Mutation wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR mit *c-gvpE* x pBIKS+ (Armbruster, 1997) als Matrize und den Oligonukleotiden cE-D116A5' und cE-D116A3' eingeführt. Das pJAS35-Konstrukt entstand durch Exzision des *NcoI*-*Acc65I*-Fragmentes aus dem pBIKS+-Konstrukt und Insertion in pJAS35.

cE_{Y124A} enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 3 Nukleotiden an Position 371-373 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu dem Aminosäureaustausch Y124A in cGvpE. Die Mutation wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR mit *c-gvpE* x pBIKS+ (Armbruster, 1997) als Matrize und den Oligonukleotiden cE-Y123A5' und cE-Y123A3' eingeführt. Das pJAS35-Konstrukt

entstand durch Exzision des *NcoI*-*Acc65I*-Fragmentes aus dem pBIIKS+-Konstrukt und Insertion in pJAS35.

cE_{Y147A} enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 3 Nukleotiden an Position 439-441 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu dem Aminosäureaustausch Y147A in cGvpE. Die Mutation wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR mit *c-gvpE* x pBIIKS+ (Armbruster, 1997) als Matrize und den Oligonukleotiden cE-Y146A5' und cE-Y146A3' eingeführt. Das pJAS35-Konstrukt entstand durch Exzision des *NcoI*-*Acc65I*-Fragmentes aus dem pBIIKS+-Konstrukt und Insertion in pJAS35.

cE_{D151A} enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 452-453 in pJAS35. Die Substitutionen führten zu dem Aminosäureaustausch D151A in cGvpE. Die Mutation wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR mit *c-gvpE* x pBIIKS+ (Armbruster, 1997) als Matrize und den Oligonukleotiden cE-D150A5' und cE-D150A3' eingeführt. Das pJAS35-Konstrukt entstand durch Exzision des *NcoI*-*Acc65I*-Fragmentes aus dem pBIIKS+-Konstrukt und Insertion in pJAS35.

***c-gvpE*_{Mut} Leserahmen im Expressionsvektor pJAS_t**

pJAS_t ist ein Derivat des halobakteriellen Expressionsvektors pJAS35 (Pfeifer *et al.*, 1994). Im pJAS_t-Vektor wurde der *fdx*-Leserahmen entfernt und durch eine multiple Klonierungsregion ersetzt, die neben den Schnittstellen für *NcoI* und *Acc65I* auch eine Schnittstelle für *NdeI* enthält. In 3'-Richtung der *Acc65I*-Schnittstelle wurde die *p-gvpA*-Terminatorsequenz inseriert (Zimmermann unveröffentlicht, 2003).

cE-Mut1 enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 164-165 in pJAS_t. Die Substitution führte zu dem Aminosäureaustausch D55A in der Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins (Anderl, 2004).

cE-Mut3 enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2x2 Nukleotiden an Position 212-213, 215-216 in pJAS_t. Die Substitutionen führten zu den zwei Aminosäureaustauschen DD71-72AA in der Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins (Anderl, 2004).

cE-Mut5 enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden an Position 263-264 in pJAS_t. Die Substitution führte zu dem Aminosäureaustausch D88A in der Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins (Anderl, 2004).

***bgaH*-Fusionskonstrukte im Expressionsvektor pWL102**

Zur Expression von Leserahmen mit eigenem Promotor wurde der halobakterielle *shuttle*-Vektor pWL102 (Lam & Doolittle, 1989 und 1992) verwendet. Als Selektionsgene trägt pWL102 das β -Lactamase-Gen für eine Ampicillin-Resistenz in *E. coli*-Transformanten und das aus *Hfx. volcanii* stammende Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase-Gen (HMG-CoA-Reduktase, Lam & Doolittle, 1989) für die Selektion in Haloarchaea. Durch die Überproduktion der HMG-CoA-Reduktase kommt es in *Hfx. volcanii* zu einer Resistenz gegenüber Mevinolin (bzw. Lovastatin), einem Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase.

pA-*bgaH* enthält das 127 bp große p-*gvpA*-Promotor-Fragment und die ersten 18 Nukleotide des p-*gvpA*-Leserahmens fusioniert vor den *bgaH*-Leserahmen im halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102. Das P_{pA} -Promotorfragment wird von den Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Nco*I, und das *bgaH*-Fragment von *Xba*I und *Bam*HI flankiert (Gregor, 2002).

pD WT enthält die intergene Region zwischen den Promotoren P_{pA} und P_{pD} , die 70 bp große p-*gvpD*-Promotorregion bis zum Transkriptionsstart, die ersten 18 Nukleotide des p-*gvpA*-Leserahmens fusioniert vor den *bgaH*-Leserahmen in pWL102. Das pD-*bgaH*-Fragment wird von den Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Bam*HI flankiert (Bauer *et al.*, 2008).

Die im Folgenden aufgeführten modifizierten P_{pD} -Promotorsequenzen wurden *in vitro* mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR hergestellt, wobei das pD WT-Konstrukt im pBlueskript II SK+-Vektor als Matrize diente. Die pWL102-Konstrukte entstanden durch Exzision des jeweiligen Promotorkonstruktes als *Bam*HI-*Xba*I-Fragment aus den entsprechenden pBIISK+-Konstrukten und Insertion in den halobakteriellen Expressionsvektor pWL102.

pD_{Mut1} bis pD_{Mut12} enthalten jeweils eine Substitution von 4 Nukleotiden (bzw. 3 Nukleotiden bei pD_{Mut12}) stromauf und stromab der TATA-Box und des BR-Elements des p-*gvpD*-Promotors. Durch den Primer 3'-pD1 und die jeweiligen die Mutation tragenden 5'-Primern (pDMut1/5' bis pDMut4/5') sowie pDMut5-12/5' und die jeweiligen die Mutation tragenden 3'-Primern (pDMut5/3' bis pDMut12/3') konnten die gewünschten Substitutionen eingeführt werden.

pD1+1, pD1+Δ2 enthalten jeweils eine Substitution der acht Nukleotid langen proximal zum P_{pD} -Promotor gelegenen putativen GvpE-Bindestelle. Im Falle des pD1+1-Konstrukts erfolgte die Substitution durch die Sequenz der acht Nukleotid langen distalen putativen GvpE-Bindestelle, und im Falle des pD1Δ2-Konstrukte durch die acht Nukleotid lange Sequenz GTCTGATT. Von dieser Sequenz ist bereits bekannt, dass sie nicht als GvpE-Bindestelle fungieren kann (Reuff, 2005). Durch die Primer 3'-pD1 und 5'pD1+1 oder

5'pD1delta2 konnten die gewünschte Substitutionen in die P_{pD} -Promotorregion eingeführt werden.

pD2+2, pDΔ1+2 enthalten jeweils eine Substitution der acht Nukleotid langen distal zum P_{pD} -Promotor gelegenen putativen GvpE-Bindestelle. Innerhalb des pD2+2-Konstrukts erfolgte die Substitution durch die acht Nukleotid lange proximale putative GvpE-Bindestelle und innerhalb des pDΔ1+2-Konstrukts durch die acht Nukleotid lange Sequenz GTCTCACC. Von dieser Sequenz ist bekannt, dass sie nicht als GvpE-Bindestelle fungieren kann (Reuff, 2005). Durch die Primer 3'-pD2 und 5'pD2+2 oder 5'pDdelta1+2 konnten die gewünschten Substitutionen in die P_{pD} -Promotorregion eingeführt werden.

pApD WT enthält den p-*gvpA*-Leserahmen mit einer Substitution von insgesamt neun Nukleotiden beginnend mit dem 28. Nukleotid durch drei Translationsterminations-Signale (UGA-Stopcodons), den p-*gvpA*-Promotor, die intergene Region zwischen den Promotoren P_{pA} und P_{pD} , die p-*gvpD*-Promotorregion bis zum Transkriptionsstart, die ersten 18 Nukleotide des p-*gvpA*-Leserahmens fusioniert vor den *bgaH*-Leserahmen in pWL102. Das pApD-*bgaH*-Fragment wird von den Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *BamHI* flankiert (Marschaus, 2007; wurde in Bauer *et al.*, 2008 als pA-pD_{UGA} publiziert).

Die drei im Folgenden aufgeführten modifizierten P_{pA} - P_{pD} -Promotorsequenzen wurden *in vitro* mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR hergestellt, wobei das pA-pD_{UGA}-Konstrukt im pBIISK+-Vektor als Matrize diente. Die pWL102-Konstrukte entstanden durch Exzision des jeweiligen Promotorkonstruktes als *BamHI*-*XbaI*-Fragment aus den entsprechenden pBlueskript II SK (+)-Konstrukten und Insertion in den halobakteriellen Expressionsvektor pWL102.

pDΔ1+2(pApD) enthält eine Substitution von sieben Nukleotiden der distalen putativen GvpE-Binderegion des P_{pD} -Promotors durch die sieben Nukleotid lange *nonsense* Sequenz TGTAGAC. Durch die Primer 3'-pA2 und pDpA(delta1)5' konnten die gewünschte Substitution in die P_{pA} - P_{pD} -Promotorregion eingeführt werden.

pD1+1(pApD), pD1+Δ2(pApD) enthalten jeweils eine Substitution der acht Nukleotid langen proximal zum P_{pD} -Promotor gelegenen putativen GvpE-Bindestelle. Im Falle des pD1+1(pApD)-Konstrukts erfolgte die Substitution durch die Sequenz der acht Nukleotid langen distalen putativen Gvp-Bindestelle, und im Falle des pD1Δ2(pApD)-Konstrukts durch die acht Nukleotid lange Sequenz GTCTGATT. Von dieser Sequenz ist bereits bekannt, dass sie nicht als GvpE-Bindestelle fungieren kann (Reuff, 2005). Durch die Primer 3'-pD1 und 5'pD1+1 oder 5'pD1delta2 konnten die gewünschten Substitutionen in die P_{pA} - P_{pD} -Promotorregion eingeführt werden.

pgvpD-pDpA enthält den p-gvpD-Leserahmen, den p-gvpD-Promotor, die intergene Region zwischen den Promotoren P_{pD} und P_{pA} , die p-gvpA-Promotorregion, die ersten 18 Nukleotide des p-gvpA-Leserahmens fusioniert vor den bgaH-Leserahmen in pWL102. Dieses Konstrukt wurde wie folgt generiert: mit den Oligonukleotiden 3'PpA-bgaH/NcoI und 5'p-gvpD/XbaI wurde mittels PCR (ausgehend von der p-vac-Region in pWL102) ein 1861 bp-Fragment erzeugt, welches mit Hilfe der künstlich eingefügten Schnittstellen NcoI und XbaI in ein bestehendes bgaH-Konstrukt inseriert wurde. Dafür wurde das pA-bgaH-Konstrukt in pBSKII+ mit den Restriktionsenzymen XbaI und NcoI hydrolytisch gespalten, was zu einer Exzision des P_{pA} -Promotorfragments führte. Das o.g. PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt, mit NcoI und XbaI hydrolytisch gespalten und zusammen mit dem restringierten bgaH x pBIISK+ in eine Ligation eingesetzt. Die Sequenz wurde per Sequenzanalyse überprüft. Die Insertion in den halobakteriellen Expressionsvektor pWL102 erfolgte in ein bestehendes bgaH x pWL102-Konstrukt über die nativ in dem bgaH-Leserahmen vorliegende Erkennungssequenz von AarI. Dafür wurde das pgvpD-pDpA-Konstrukt in pBSKII+ und das pA-bgaH-Konstrukt in pWL102 mit den Restriktionsenzymen XbaI und AarI hydrolytisch gespalten und die entsprechenden Fragmente in eine Ligation eingesetzt.

Die Insertion aller folgenden modifizierten P_{pD} - P_{pA} -Promotorsequenzen in pWL102 erfolgte nach diesem Schema. Deshalb wird im Folgenden auf eine jeweilige Beschreibung verzichtet.

pD_{UGA}pA ist analog zu pgvpD-pDpA aufgebaut, enthält jedoch beginnend mit dem 31. Nukleotid im p-gvpD-Leserahmen eine Substitution von insgesamt neun Nukleotiden durch drei Translationsterminations-Signale (UGA-Stopcodons). Das Konstrukt wurde *in vitro* mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden 5'p-gvpD+UGA und 3'p-gvpD+UGA hergestellt. Als Matrize diente pgvpD-pDpA in pBSKII+.

Die im Folgenden aufgeführten modifizierten P_{pD} - P_{pA} -Promotorsequenzen wurden *in vitro* mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR hergestellt, wobei das pD_{UGA}pA-Konstrukt im pBIISK+-Vektor als Matrize diente.

pAΔ1+2(pDpA) enthält eine Substitution von sieben Nukleotide der distalen putativen GvpE-Binderegion des P_{pA} -Promotors durch die Sequenz GTCTACA. Durch die Primer 3'-pA2 und pDpA(delta1)5' konnten die gewünschte Substitution in die P_{pA} - P_{pD} -Promotorregion eingeführt werden.

pA1+1(pDpA), pA1+Δ2(pDpA) enthalten jeweils eine Substitution der acht Nukleotide langen proximal zum P_{pA} -Promotor gelegenen putativen GvpE-Bindestelle. Im Falle des pA1+1(pDpA)-Konstrukts erfolgte die Substitution durch die Sequenz der acht Nukleotide langen distalen putativen GvpE-Bindestelle, und im Falle des pA1Δ2(pDpA)-Konstruktes

durch die acht Nukleotide lange Sequenz GTCTGATT. Von dieser ist bereits bekannt, dass sie nicht als GvpE-Bindestelle fungieren kann (Reuff, 2005). Durch die Primer 3'-pA1 und 5'pA1+1delta2 oder pA1delta2(2)5' konnten die gewünschten Substitutionen in die P_{pA} - P_{pD} -Promotorregion eingeführt werden.

pDpA-BRE enthält den Austausch der BR-Elemente der beiden gegenläufig zueinander orientierten Promotoren P_{pD} und P_{pA} mit der Sequenz des BR-Elementes des jeweils gegenüberliegenden Promotors. Die Substitutionen wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen eingeführt, wobei bei der ersten Reaktion mit den Oligonukleotiden 5'pDpA-DBRE und 3'pA1 die BRE-Sequenz des P_{pA} -Promotors durch die BRE-Sequenz des P_{pD} -Promotors ersetzt wurde. Bei der zweiten Reaktion diente das bei der ersten PCR entstandene Konstrukt als Matrize. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden pApD-A-BRE3' und pApD-A-BRE5'. Hierbei wurde die BRE-Sequenz des P_{pD} -Promotors durch die des P_{pA} -Promotors ersetzt.

pDpA-TATA enthält den gegenseitigen Austausch der TATA-Box-Sequenzen der Promotoren P_{pD} und P_{pA} . Die Substitutionen wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen eingeführt, wobei bei der ersten Reaktion mit den Oligonukleotiden pDpA-D-TATA5' und pDpA-D-BRE+TATA3' die TATA-Box-Sequenz des P_{pA} -Promotors durch die des P_{pD} -Promotors ersetzt wurde. Bei der zweiten Reaktion diente das bei der ersten PCR entstandene Konstrukt als Matrize. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden pApD-A-TATA3' und pApD-A-BRE+TATA5'. Hierbei wurde die TATA-Box-Sequenz des P_{pD} -Promotors durch die des P_{pA} -Promotors ersetzt.

pDpA-B+T enthält den gegenseitigen Austausch der TATA-Box- und BRE-Sequenzen der Promotoren P_{pD} und P_{pA} . Die Substitutionen wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen eingeführt, wobei bei der ersten Reaktion mit den Oligonukleotiden pDpA-D-BRE+TATA5' und pDpA-D-BRE+TATA3' die TATA-Box- und BRE-Sequenz des P_{pA} -Promotors durch die des P_{pD} -Promotors ersetzt wurde. Bei der zweiten Reaktion diente das bei der ersten PCR entstandene Konstrukt als Matrize. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden pApD-A-BRE+TATA3' und pApD-A-BRE+TATA5'. Hierbei wurde die TATA-Box- und BRE-Sequenz des P_{pD} -Promotors durch die des P_{pA} -Promotors ersetzt.

pDpAinvE enthält den Austausch der putativen GvpE-Bindestellen zwischen den Promotoren P_{pD} und P_{pA} durch Inversion der intergenen Region. Durch die Oligonukleotide pApD-invert-rev5' und -3' konnte die intergene Region zwischen beiden Promotoren invertiert werden.

pDpAinvE+B ist analog zu pDpAinvE aufgebaut; die Inversion der intergenen Region umfasst jedoch zusätzlich die BRE-Sequenzen von P_{pD} und P_{pA} . Die Substitutionen wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen eingeführt, wobei bei der ersten Reaktion

(Matrize: pDpAinvE) mit den Oligonukleotiden pDpA-inv(ABRE)5' und pDpA-inv(A)3' die BRE-Sequenz des P_{pA} -Promotors durch die BRE-Sequenz des P_{pD} -Promotors ersetzt wurde. Bei der zweiten Reaktion diente das bei der ersten PCR entstandene Konstrukt als Matrize. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden pDpA-inv(DBRE)5' und pDpA-inv(D)3'. Hierbei wurde die BRE-Sequenz des P_{pD} -Promotors durch die des P_{pA} -Promotors ersetzt.

pDpAinvE+B+T ist analog zu pDpAinvE+B aufgebaut, enthält jedoch zusätzlich den gegenseitigen Austausch der TATA-Box-Sequenzen von P_{pD} und P_{pA} . Die Substitutionen wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen eingeführt, wobei bei der ersten Reaktion (Matrize: pDpAinvE+B) mit den Oligonukleotiden pDpA-inv(ABR+TA)5' und pDpA-inv(A)3' die TATA-Box-Sequenz des P_{pA} -Promotors durch die des P_{pD} -Promotors ersetzt wurde. Bei der zweiten Reaktion diente das bei der ersten PCR entstandene Konstrukt als Matrize. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden pDpA-inv(DBR+TA)5' und pDpA-inv(D)3'. Hierbei wurde die TATA-Box-Sequenz des P_{pD} -Promotors durch die des P_{pA} -Promotors ersetzt.

3.2.8 Plasmidisolierung aus *Hfx. volcanii*

Plasmide aus *Hfx. volcanii* WFD11-Transformanten wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Abweichend vom Protokoll wurde zum Resuspendieren des Zellsedimentes anstatt des Puffers P1 ein für die Plasmidisolierung aus Halobakterien angepasster Resuspendierungs-Puffer (1 M NaCl, 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH8,0) verwendet. Nach Zugabe von 350 µl N3 erfolgte eine Inkubation für 5 min auf Eis. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit 30 µl doppelt deionisiertem H₂O bei Zimmertemperatur.

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1988) wurde verwendet, um DNA-Fragmente von genomischer halobakterieller DNA oder Plasmid-DNA zu amplifizieren. Durch PCR wird die Einführung von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und Mutationen in die Zielsequenz ermöglicht. Die Reaktion wurde in einem rechnergesteuerten T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Der initiale Denaturierungsschritt der DNA-Matrize erfolgte für 5 min bei 95°C. Die Anlagerung der synthetischen Oligonukleotide erfolgte für 1 min bei einer ihrer Länge und ihres GC-Gehaltes entsprechenden Temperatur. Im dritten Schritt folgte die

Polymerisation bei 72°C für einen Zeitraum von 1 min pro zu amplifizierendem kb DNA. Es folgten 30 bis 35 identische Zyklen, wobei die Denaturierungszeit auf 30 sec reduziert wurde. In einem abschließenden Zyklus wurde die Polymerisationszeit auf 10 min erhöht, um alle Matrizenstränge nach Anlagerung der Oligonukleotide vollständig zu verlängern. Anschließend wurden die Amplifikate auf 1-2%igen Agarosegelen analysiert.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze:

genomische oder Plasmid-DNA	25-50 ng
Reaktionspuffer (-MgCl ₂)	1/10 vol
MgCl ₂	1-5 mM
dNTP-Mix (2mM)	6 µl
Primer	je 25 pmol
<i>Taq</i> -Polymerase	1,9 U
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,05 U
Doppelt deionisiertes H ₂ O	ad 50 µl

3.2.10 Ortsspezifische Mutagenese-PCR

Die ortsspezifische Mutagenese-PCR stellt eine Methode dar, um gezielt Substitutionen, Deletionen und Insertionen in doppelsträngige Plasmid-DNA einzuführen. Der Einsatz der DNA-Polymerase *PfuUltra*, erlaubt die Einführung von Mutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA *in vitro*. Dies erfolgt durch Amplifikation des gesamten Vektors inklusive Inserts in einem PCR-Schritt. Somit ist keine anschließende Klonierung des PCR-Produkts in den Ziel-Vektor erforderlich. Neben zirkulärer, doppelsträngiger Plasmid-DNA als Matrize werden zwei synthetische Oligonukleotide benötigt, die jeweils zu einem Strang des Vektors komplementär sind und die gewünschten Mutationen enthalten. Die Sequenz der synthetischen Oligonukleotide richtet sich nach den einzuführenden Mutationen.

Sollen im gleichen Bereich der DNA-Matrize unterschiedliche Mutationen eingeführt werden, sollten die synthetischen Oligonukleotide mit ihren 5'-Enden direkt aneinander lagern und die zu amplifizierende Region begrenzen, wobei einer der beiden Oligonukleotide die jeweilige Mutation enthält. Die synthetischen Oligonukleotide werden durch die *PfuTurbo*® DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung verlängert und es entsteht ein linearisiertes Vektor-Fragment mit glatten Enden (*blunt ends*). Vor der Transformation von *E. coli* Top10F⁻ Zellen, müssen die 5'-Enden der amplifizierten Plasmid-DNA phosphoryliert und in einer nachfolgenden Ligation die Enden zu einem zirkulären Plasmid verknüpft werden.

Alternativ dazu können zwei komplementäre, sich komplett überlappende Oligonukleotide gewählt werden, die beide die gewünschte Mutation in der Mitte ihrer Sequenz tragen. Dabei ist darauf zu achten, dass die mutationstragende Sequenz 5' und 3' von mindestens 10 zur Zielsequenz komplementären Nukleotiden flankiert wird. Falls der zu mutierende Bereich einen längeren DNA-Abschnitt umfasst, können die Oligonukleotide so gewählt werden, dass die Mutation auf beide 5'-Enden aufgeteilt wird, sich ihre 5'-Enden für wenige Nukleotide überlappen. Die *PfuTurbo*® DNA-Polymerase verlängert die synthetischen Oligonukleotide in 5'-3'-Richtung und es entsteht über die PCR ein linearisiertes Vektor-Fragment mit versetzten Enden (*staggered nicks*). In diesem Fall erfolgt die Transformation von *E. coli* Top10F' direkt ohne vorherige Phosphorylierung und Ligation des PCR-Produktes.

Die Reaktion wurde in einem Volumen von 25 µl oder 50 µl in einem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze (25 µl / 50 µl Ansatz)

dsDNA-Matrize	12,5-50 ng
Reaktionspuffer	1/10 vol
dNTP-Mix (2mM)	2,5 µl / 5 µl
Primer	je 62,5 ng / je 125 ng
<i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerase AD	1,25 U / 2,5 U
doppelt deionisiertes H ₂ O	ad 25 µl / ad 50 µl

Im Anschluss an die PCR wurde der Ansatz mit 10 U (50 µl Ansatz), bzw. 5 U (25 µl Ansatz) der Restriktionsendonuklease *DpnI* für 1 h bei 37°C hydrolysiert, welche spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA erkennt und spaltet. Aus *E. coli* isolierte DNA ist dam⁺ methyliert und somit angreifbar für eine *DpnI*-Hydrolyse. Auf diese Weise wird die parentale DNA-Matrize fragmentiert und die neusynthetisierte, die Mutation tragende, DNA selektiert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, und falls erforderlich, die 5'-Enden der amplifizierten Plasmid-DNA durch die T4-Phosphonukleotidkinase phosphoryliert. Hierfür wurden 18 µl des PCR-Produktes mit 2 µl T4-Ligase-Puffer und 10 U T4-Phosphonukleotidkinase versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz abgekühlt und mit 400 U T4-DNA-Ligase für 1 h bei ZT inkubiert. Die folgende Transformation von *E. coli* Top10F' Zellen erfolgte mit dem kompletten Ligationsansatz.

3.2.11 Molekularbiologische Standardtechniken

Die hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Empfehlung des Herstellers.

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch mit 1-2%igen Agarosegelen. Als Gelpuffer wurde 1x TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA-Puffer, Sambrook & Russell, 2001) und als Laufpuffer 0,5x TAE-Puffer verwendet. Zur Ermittlung der Größe der aufgetrennten Fragmente wurde als DNA-Größenstandard der GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 (MBI Fermentas) eingesetzt. Vor der Auftrennung wurden die DNA-Proben mit DNA-Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 50% Saccharose, 0,1 M EDTA) versetzt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Inkubation mit Ethidiumbromid (1 µg/ml in H₂O) und Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm (Sambrook & Russell, 2001).

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) oder dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem GeneElute™ PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach Angaben des Herstellers.

Für die Ligation wurden linearisierte Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis 1:5 oder 1:10 an freien Enden zusammengegeben (Sambrook & Russell, 2001) und 90 min bei 20°C mit T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) inkubiert.

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) oder dem E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, USA) durchgeführt.

Die DNA-Sequenzierungen wurden vom Sequencing Service des Biozentrums der LMU München durchgeführt.

3.2.12 Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analysen

Die zu untersuchenden Plasmidkonstrukte wurden mit geeigneten Restriktions-Endonukleasen hydrolytisch gespalten und die DNA-Fragmente über 1%ige Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarosegele wurden anschließend für eine partielle Depurinierung 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Zur folgenden Denaturierung und Neutralisierung wurden die Gele für je 15 min in 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl/0,5 M Tris-HCl pH 7,4 inkubiert. Der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte per Kapillarblot nach der Methode von Southern (1975) und

Sambrook & Russel (2001) mit 20x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0) über Nacht. Anschließend wurde die DNA mittels UV-Crosslink (UV-Crosslinker, Stratagene) kovalent auf der Membran fixiert.

Zum spezifischen Nachweis von DNA-Fragmenten wurden Digoxigenin-markierte DNA-Sonden verwendet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für 2 h mit Hybridisierungslösung (50% (v/v) Formamid, 2% (v/v) Blockierungsreagenz, 0,1% (v/v) Laurylsarcosin, 0,02% (v/v) SDS, 5x SSC) bei 42°C inkubiert. Die Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde erfolgte über Nacht bei 42°C. Das Waschen der Membran erfolgte nach Sambrook & Russel (2001). Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

3.2.13 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Die Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden erfolgte mit dem DIG DNA Labeling Mix (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurde die DNA-Sonde mittels PCR amplifiziert und dabei durch den Einbau von Digoxigenin-markierten dUTPs markiert. Die PCR wurde in einem Thermocycler (T3000, Biometra) durchgeführt und die Zyklusparameter entsprechend des zu amplifizierenden DNA-Fragments gewählt.

Die Herstellung der *p-gvpE*-DNA-Sonde erfolgte ausgehend von der *p-vac*-Region in pWL102 mit den Oligonukleotiden pE1 und pE2.

3.2.14 Isolierung der Gesamt-RNA aus *Haloferax volcanii*

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *Hfx. volcanii*-Transformanten erfolgte nach der Methode von Chomczynski & Sacchi (1987). Dafür wurden 4 bis 6 ml einer spätexponentiellen Kultur entnommen und sedimentiert. Abweichend vom Protokoll wurde nach der ersten Fällung der RNA eine weitere Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Das RNA-Sediment der zweiten Isopropanol-Präzipitation wurde mit 70% Ethanol (in DEPC-behandeltem, deionisiertem Wasser) gewaschen, getrocknet und in 50 µl DEPC-behandeltem, deionisiertem Wasser gelöst.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch an einem Nanodrop1000 Spectrophotometer (peqlab, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

3.2.15 Northern-Analyse

Zur Transkriptionsanalyse wurden 2 µg der isolierten Gesamt-RNA über denaturierende, formaldehydhaltige 1,2%ige Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert (Ausubel *et al.*, 1988). Als Transferpuffer wurde 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0) verwendet. Die Fixierung der RNA auf der Nylonmembran durch kovalente Bindung wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht in einem Crosslinker-Gerät (UV-Crosslinker, Stratagene) erreicht. Als Transferkontrolle wurde die Membran mit Methylenblau (0,04% (w/v) Methylenblau, 0,5 M Natriumacetat pH 5,5) inkubiert und anschließend mit deionisiertem H₂O wieder entfärbt. Durch das Färben mit Methylenblau kann die 16S- und 23S-rRNA visualisiert und somit die auch die Qualität und Menge der RNA beurteilt werden.

Die Hybridisierung der strangspezifischen RNA-Sonden mit der auf der Nylonmembran fixierten RNA erfolgte nach dem Protokoll von Ausubel *et al.* (1988). Abweichend vom Protokoll wurde der Hybridisierungslösung zusätzlich 10% (w/v) Dextransulfat, 1 % (w/v) SDS und 0,5% (w/v) Magermilchpulver zugegeben. Die Vorhybridisierung erfolgte für 2-4 h bei 42°C in 25 ml Hybridisierungslösung. Anschließend wurden die für 10 min bei 65°C denaturierten Digoxigenin-markierten RNA-Sonden zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht. An die Hybridisierung folgend wurde die Membran mit 0,2% SSC, 0,1% SDS für 20 min bei 55°C und jeweils 30 min bei 60°C und 65°C gewaschen. Die Detektion der RNA-Fragmente erfolgte mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

3.2.16 Dot-Blot-Analyse

Für die RNA-Analysen mittels Dot-Blot wurde eine Minifold I Dot-Blot System Apparatur von Schleicher & Russel verwendet. Die Einzelteile wurden vor Verwendung über Nacht in 70%iges Ethanol eingelegt und anschließend mit destilliertem H₂O gewaschen. Nach Zusammenbau und Anlegen eines Vakuums wurde die Apparatur mehrfach mit DEPC-behandeltem H₂O durchgespült. Für den Blot erfolgte der Aufbau der Apparatur unter Verwendung von zwei Lagen in 10x SSC-Puffer getränktes Whatman-Papier und einer in 10x SSC-Puffer getränkte Nylonmembran (Pall Gelman GmbH, Dreieich). Die RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen und mit dem vierfachen Volumen denaturierendem RNA-Mix (250 µl Formamid, 83 µl 37%iger Formaldehyd, 50 µl 1x MOPS-Gelpuffer pH 8) versetzt. Nach der Denaturierung (10 min, 65°C) wurden die Ansätze mit dem doppelten Volumen 20X SSC-Puffer vermischt. Die RNA-Proben wurden auf zwei Mal in die Blot-Apparatur pipettiert und jeweils durch Anlegen eines Vakuums auf die Nylonmembran transferiert. Das Fixieren der RNA auf der

Membran erfolgte mittels Quervernetzung durch UV-Licht (UV-Crosslinker, Stratagene). Im Anschluss wurde mit der Membran wie unter dem Abschnitt 3.2.15 (Northern-Analyse) beschrieben weiter verfahren.

3.2.17 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

Die strangspezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Sonden wurden mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) synthetisiert. Die Sonden wurden im Verhältnis 1:5000 in Hybridisierungslösung aufgenommen.

bgaH-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit dem Transkript des *bgaH*-Leserahmens hybridisiert, erfolgte mit einem Konstrukt, das ein 2,2 kb großes *NcoI*-*BamHI*-*bgaH*-Fragment in pBSKII(+) enthält (Gregor, 2002). Nach Linearisierung des Plasmidkonstruktes mit *NcoI* erfolgte die *in vitro*-Transkription der RNA-Sonde mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase.

p-gvpA-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit dem Transkript des *p-gvpA*-Leserahmens hybridisiert, erfolgte mit einem Konstrukt, das ein 362 bp großes *XbaI*-*EcoRI*-*p-gvpA*-Fragment in pBSKII(+) enthält (Sartorius-Neef, 2005). Nach Linearisierung des Plasmidkonstruktes mit *EcoRI* erfolgte die *in vitro*-Transkription der RNA-Sonde mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase.

p-gvpD-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit dem Transkript des *p-gvpD*-Leserahmens hybridisiert, erfolgte mit dem DL+DxpBSKII+-Konstrukt. Nach Linearisierung des Plasmidkonstruktes mit *XbaI* erfolgte die *in vitro*-Transkription der RNA-Sonde mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase.

Konstrukt zur Herstellung der DIG-p-gvpD-RNA-Sonde

DL+D x pBSKII+ enthält ein 249 bp großes *XbaI*-*BamHI*-Fragment mit der *p-gvpD*-*leader*-Region und den ersten 178 Nukleotiden des *p-gvpD*-Leserahmens. Das DL+D-Fragment wurde mittels PCR mit pDpA x pBSKII+ als Matrize und den Oligonukleotiden 5'DL-*XbaI* und 3'DL+D-*BamHI* hergestellt. Die Insertion in pBSKII+ erfolgte mit Hilfe der künstlich eingeführten *XbaI*- und *BamHI*-Schnittstellen.

3.2.18 Hydrolyse von DNA in isolierter Gesamt-RNA

Zum Einsatz von Gesamt-RNA in die Reverse Transkriptions-Reaktion (RT-Reaktion) und folgender Real-Time-PCR, musste diese vorerst vollständig von kontaminierender DNA gereinigt werden. Das Vorhandensein von DNA kann das Ergebnis der an die RT-Reaktion folgenden PCR verfälschen, da sie neben der synthetisierten cDNA ebenfalls als Matrize für die *Taq*-DNA-Polymerase fungiert. Die Hydrolyse mit DNaseI erfolgte nach Angabe des Herstellers MBI Fermentas. Hierfür wurden 3 µg RNA mit DNaseI-Reaktionspuffer (+MgCl₂) oder DNaseI-Reaktionspuffer (- MgCl₂) und 3 µl MnCl₂ mit 3 Units DNaseI (1 U/µl, RNase-frei) versetzt und auf 30 µl mit HPLC-H₂O aufgefüllt. Die Ansätze wurden 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der DNaseI erfolgte durch Zugabe von 3 µl EDTA (25 mM) und Inkubation für 10 min bei 65°C. Die Hydrolyse der DNA wurde mittels PCR mit 30 ng RNA (nach DNaseI-Behandlung) als Matrize, *Taq*-DNA-Polymerase und den in Tabelle 1 aufgeführten spezifischen für die Real-Time-PCR synthetisierten Oligonukleotiden kontrolliert. Als Positivkontrolle wurde 25 ng Plasmid-DNA bzw. genomischer DNA aus *Hfx. volcanii* (zur Verfügung gestellt von A. Bleiholder; Bleiholder 2009) als Matrize und als Negativ-Kontrolle 2 µl HPLC-H₂O eingesetzt. Die RNA wurde was DNA-frei angesehen, wenn keine Amplifikate gebildet wurden. Zur weiteren Reinigung der RNA folgte eine Behandlung nach dem RNA Clean up Protokoll des RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden.

3.2.19 Reverse Transkription (RT-Reaktion)

Die cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription wurde mit DNA-freier RNA als Matrize nach dem Protokoll des Herstellers der verwendeten Reversen Transkriptase (RevertAid™M-MuLV Reverse Transkriptase, MBI Fermentas) sowie Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Zu je 300 ng RNA wurden 0,2 µg *random hexamer primer* und HPLC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl zugegeben. Der Ansatz wurde 5 min bei 70°C inkubiert, auf Eis abgekühlt, mit Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM) sowie 20 U Ribonuklease-Inhibitor (RiboLock™ RNase Inhibitor, MBI Fermentas) ergänzt und mit HPLC-H₂O auf 19 µl aufgefüllt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 25°C folgte die Zugabe von 200 U Reverser Transkriptase (RTase). Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte durch Inkubation der Ansätze für 10 min bei 25°C und weiteren 60 min bei 42°C. Die Inaktivierung der RTase erfolgte für 10 min bei 70°C. Als Kontrolle wurden Reaktionsansätze mitgeführt, die entweder keine RTase (-RT) oder keine Matrize (-t) enthielten. Das fehlende Volumen wurde mit HPLC-H₂O ausgeglichen.

3.2.20 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Zur Analyse der in der RT-Reaktion synthetisierten cDNA diente eine Reverse Transkriptions-PCR mit je 2 µl der synthetisierten RT-Produkte als Matrize. Zur Amplifikation der *p-gvpD* und *rpoB'* Fragmente wurden die in Tabelle 1 aufgeführten spezifischen Oligonukleotide eingesetzt. Die Oligonukleotide sollten spezifisch die jeweilige cDNA aus der Vielzahl der synthetisierten cDNAs amplifizieren, die anhand der spezifischen mRNA (*p-gvpD* und *rpoB'*) generiert wurde. Entstehende Amplifikate in den RT-Kontrollreaktionen –RT oder –t lassen auf DNA-Kontaminationen schließen, was eine Verfälschung der Ergebnisse darstellt. Eine PCR ohne Matrize diente der Sterilkontrolle der PCR-Lösungen und ein Ansatz mit je 25 ng Plasmid-DNA bzw. genomischer DNA aus *Hfx. volcanii* (zur Verfügung gestellt von A. Bleiholder; Bleiholder 2009) zur Kontrolle der Spezifität. Je 10 µl der Reaktionen wurde anschließend auf einem 2%igem Agarosegel analysiert.

3.2.21 Quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR)

Die Methode der qRT-PCR wurde neben dem ONPG-Test (siehe Abschnitt 3.3.4) gewählt, um die Aktivität der Promotoren P_{pA} und P_{pD} im dualen Promotorkonstrukt zeitgleich analysieren zu können. Dafür sollte die Analyse der Promotoraktivität des einen Promotors über Messung der BgaH-Aktivität und die des gegenüberliegenden Promotors über Quantifizierung der von diesem Promotor aus gebildeten Transkriptmengen erfolgen. Die Probenentnahme für die entsprechenden Analysen (ONPG-Test bzw. Isolierung der Gesamt-RNA für cDNA-Synthese) erfolgte zeitgleich aus derselben Kultur nach 54 h in der frühstationären Wachstumsphase. Ziel war es den Einfluss unterschiedlicher Mutationen auf die Promotoraktivität beider Promotoren simultan in den Proben zu untersuchen.

Die qRT-PCR wurde in dem StepOne™ Real-Time PCR System mit dem Power SYBR® Green PCR Master Mix nach Angaben des Herstellers Applied Biosystems durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte über SYBR-Green, welches in doppelsträngige DNA interkaliert. Der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 498 nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 522 nm. Dabei ist die Zunahme des Fluoreszenzsignals proportional zu der Menge an synthetisiertem Produkt und es entsteht ein messbarer Zusammenhang zwischen Absorption und DNA-Menge.

Als Quantifizierungsstrategie wurde entweder die absolute Quantifizierung anhand einer gegebenen Kalibrierkurve oder die relative Quantifizierung gewählt. Bei letzterer Strategie wurde die Expression des Zielgenes auf ein zweites, nichtreguliertes Referenzgen (*rpoB'*) bezogen.

Zusammensetzung der qRT-PCR-Ansätze:

Volumen	Reagenzien	Endkonzentration
5 µl	2x Power SYBR® Green PCR Mastermix	-
2 µl	cDNA (5 ng/µl)	1 ng/µl
3 µl	Oligonukleotid-Mix (5 pmol/µl)	0,5 pmol/µl

Temperaturprofil der qRT-PCR:

Temperatur	Anzahl der Zyklen	Dauer
95°C	1	5 min
95°C	40	15 sec
60/65°C		45 sec
72°C		1 min

Um die Uniformität der Produkte zu kontrollieren, wurde für jeden Ansatz im Anschluss an die qRT-PCR eine Schmelzkurve der Produkte ermittelt. Der C_T -Wert (Schwellenwert) wurde für jedes zu quantifizierende Fragment dreifach ermittelt. Zur Qualitätssicherung der Analyse wurden Ansätze ohne Matrize und die jeweilige –RT-Kontrolle mitgeführt und die synthetisierten Produkte anhand ihrer Schmelzkurven kontrolliert. Sollte die Quantifizierung über die Bestimmung der absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen erfolgen, wurde eine Standardkurve mit bekannter Kopienzahl als Matrize bestimmt. Zur Ermittlung der Eichreihe des *p-gvpD*-Leserahmens wurde eine serielle Verdünnung mit definierter Plasmidanzahl des pDpA-Konstrukts in pBIISK+ erstellt. In den qRT-PCR-Analysen wurde diese Eichreihe parallel zu der cDNA der unterschiedlichen Transformanten vermessen. Somit entstand ein Bezug zwischen Kopienzahl des *p-gvpD*-Leserahmens und den gemessenen C_T -Werten. Anhand der Standardkurven konnten die für die Transformanten ermittelten C_T -Werte einer Kopienzahl des *p-gvpD*-Transkripts zugeordnet werden. Diese Standardkurve ermöglicht es, jedem gemessenen C_T -Wert eine Kopienzahl zuzuordnen. Für den Nachweis der *p-gvpD*-Transkripte wurde ein spezifisches Oligonukleotidpaar (siehe Tabelle 1) gewählt, das die ersten 120 bp des *p-gvpD*- Leserahmens amplifizieren sollte. Für jedes zu quantifizierende Fragment wurden 3 Replikate der Standardkurve angefertigt. Im Anschluss wurden die Daten mit der StepOne™ v2.0 Software analysiert.

Wurde als Quantifizierungsstrategie die relative Quantifizierung gewählt, so wurden die Daten mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet (Livak & Schmittgen, 2001). Hierfür wurden die C_T -Werte des Kontrolltranskripts *rpoB'* zur Normalisierung der *p-gvpD* Transkriptmengen genutzt. Für die Analyse der Daten wurde die StepOne™ v2.0 Software verwendet. Für den Nachweis der *p-gvpD*- und der *rpoB'*-Transkripte wurden

spezifische Oligonukleotidpaare (siehe Tabelle 1) gewählt, die die ersten 340 bp des entsprechenden Leserahmens der jeweiligen cDNA amplifizieren sollten, um die ermittelten Daten vergleichen zu können. Auch hatten alle Oligonukleotide einen gleichen T_m -Wert, so dass alle Reaktionen unter den gleichen Bedingungen stattfinden konnten. Im Anschluss an die qRT-PCR-Reaktionen wurden von den Produkten Schmelzkurven gemessen, was der Spezifitätsüberprüfung der Amplifikation diente. Wenn sich in den Kurven nur ein Gipfel detektieren ließ, amplifizierte das entsprechende Oligonukleotidpaar spezifisch nur ein Produkt. Da mit SYBR-Green die Zunahme jeglicher DNA-Produkte gemessen wird, ist dies Voraussetzung für eine anschließende Quantifizierung.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Isolierung von Proteinen aus *Haloferax volcanii* für Western-Analysen

Die Herstellung eines Zelllysates und Isolierung von Proteinen ermöglicht mit Hilfe einer Western-Analyse den immunologischen Nachweis eines spezifischen Proteins. Hierfür wurden die löslichen Proteine aus *Hfx. volcanii* WFD11-Transformanten isoliert.

Die Probenentnahme erfolgte in der frühstationären Wachstumsphase. Es wurden 6 ml der jeweiligen Kultur in sterile Greiner-Röhrchen überführt und die Zellen 20 min bei 4000 upm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellsediment entweder bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Zur Herstellung halobakterieller Zelllysate für anschließende Western-Analysen wurden die sedimentierten Zellen in 400 µl TE-Puffer mit 1 µg/ml DNaseI resuspendiert und darin eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile und Membranfragmente wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 upm und 4°C sedimentiert. Nach Überführung des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß konnte die Proteinkonzentration mittels Bradford-Analyse bestimmt und die Proteine im Zelllysate in einer Western-Analyse untersucht werden.

3.3.2 Isolierung der löslichen Proteinfraction aus *Hfx. volcanii* für *in vitro*-Studien

Für Interaktionsstudien wurden *Hfx. volcanii* WFD11-Transformanten, die das *c-gvpE*- oder spezifisch mutierte *c-gvpE*-Gen unter Kontrolle des *Ferredoxin*-Promotors in dem Vektor pJAS35 exprimierten, in 3 M Vollmedium mit 0,2 µg/ml Novobiocin bei 37°C und 180 upm bis zu einer $OD_{600nm} \leq 1,5$ inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 ml der

Kultur bei 5000 upm und 4°C für 20 min sedimentiert und das Zellsediment in 5 ml Halo-Lysepuffer (2,5 M KCl, 50 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5% Glycerin, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch siebenminütige Ultraschallbehandlung mit einer Mikrospritze auf Eis. Anschließend wurden Zelltrümmer bei 5000 upm und 4°C für 20 min sedimentiert und die lösliche Proteinfraction des Zelllysates für Protein-Protein-Interaktionsstudien verwendet.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels der Bradford-Methode durchgeführt (Ausubel *et al.*, 1988).

Hierfür wurden 20 µl einer Proteinlösung mit 980 µl Bradford-Reagenz (0,01% (v/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 4,75% (w/v) Ethanol, 8,5% (v/v) Phosphorsäure) versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm bestimmt und anhand einer zuvor ermittelten Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) von 0,125 bis 1 mg/ml die Proteinkonzentration ermittelt.

3.3.4 Analyse der BgaH-Aktivität (ONPG-Test)

Die Analyse der Promotoraktivität in *Hfx. volcanii* WFD11-Transformanten wurde anhand von Messungen der BgaH-Aktivität als Reporter mit dem ONPG (ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid)-Test nach Holmes *et al.* (1997) durchgeführt. Hierfür wurden die verschiedenen Promotorkonstrukte mit dem *bgaH*-Leserahmen aus *Hfx. lucentense* als Reportergen fusioniert, welcher für ein halobakterielles Enzym mit β-Galaktosidase-Aktivität codiert (Holmes & Dyll-Smith, 2000).

BgaH katalysiert die β-glykosidische Spaltung des Substrats ONPG (ortho-nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid) zu Galaktose und o-Nitrophenol (ONP). Die delokalisierten π-Elektronen des ONP absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm und es erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Für die Ermittlung der Basalaktivität von bestimmten Promotoren erfolgte die Doppeltransformation von *Hfx. volcanii* WFD11-Zellen mit dem entsprechenden Promotor im halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 (Lam & Doolittle, 1989 und 1992) und dem halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 (Pfeifer *et al.*, 1993; Pfeifer *et al.*, 1994). Für die Ermittlung von induzierten Promotoraktivitäten wurden *Hfx. volcanii* WFD11-Zellen mit dem entsprechenden Promotor im halobakteriellen *shuttle*-Vektor pWL102 (Lam & Doolittle, 1989 und 1992) und dem *p-gvpE*-Leserahmen in pJAS35 (pE^{ex}; Gregor & Pfeifer, 2001) transformiert. Die *Hfx. volcanii*-Transformanten wurden in 3 M NaCl Vollmedium mit entsprechender

Antibiotikasupplementation (6 µg/ml Mevinolin und 0,2 µg/ml Novobiocin) bei 37°C und 180 upm kultiviert. Nach 54 h Wachstum wurden 100 oder 1000 µl der Zellkultur entnommen, die Zellen für 3 min bei 13000 upm sedimentiert und anschließend in 100 µl 3 M NaCl Vollmedium resuspendiert. Zur Zelllyse wurden 50 µl 2% Triton X-100 zugegeben. Anschließend wurden 800 µl ONPG-Testpuffer (2,5 M NaCl, 10 µM MnCl₂, 0,1% β-Mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl pH 7,2) und 50 µl ONPG-Stammlösung (8 mg/ml ONPG in 0,1 M Tris-HCl pH 7,2) zugegeben und der Ansatz gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Zimmertemperatur erfolgte die photometrische Messung der enzymatischen Reaktion als Absorptionsänderung pro Zeiteinheit ($\Delta A/\Delta t$) bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Messung erfolgte bei 25°C für 5 min. Ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz kann die Volumenaktivität als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit in 1 ml berechnet werden.

Lambert-Beersches Gesetz: $dA/dt = \epsilon \cdot d \cdot dc/dt$

A = Absorption

ϵ = molarer Absorptionskoeffizient [$1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

c = Konzentration [mol / l]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ für das Produkt ONP aus der β-glykosidischen Spaltung von ONPG beträgt bei 405 nm $3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Eine Einheit (Unit) der β-Galaktosidase-Aktivität ist als die Menge Enzym definiert, die die Hydrolyse von 1 µmol Substrat pro Minute katalysiert. Die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität [U/mg] ist als der Quotient aus β-Galaktosidase-Aktivität pro mg Gesamtprotein definiert. Diese kann mittels der Proteinkonzentrationsbestimmung im Rohextrakt (siehe Abschnitt 3.3.3, Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford) bestimmt werden.

3.3.5 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Schagger (Schagger & von Jagow, 1987). Vor dem Auftragen wurden die Proteine mit 3x SDS-Proteinauftragspuffer (0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 4% SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl pH 6,8) versetzt und für 2 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 1,5 bis 2,5 h bei 100 bis 130 V.

3.3.6 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

Das Färben der Proteine nach der Auftrennung in einem Polyacrylamidgel erfolgte durch Inkubation mit Coomassie-Färbelösung (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) Ethanol, 40% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) deionisiertes Wasser) für 10 min bei Zimmertemperatur. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurden die Gele anschließend in Coomassie-Entfärber (8% Essigsäure, 25% Methanol, 67% deionisiertes Wasser) über Nacht auf dem Taumler inkubiert.

3.3.7 Nachweis von Proteinen mittels Western-Analysen

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Nassblotverfahren (Towbin *et al.*, 1979) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um sie anschließend immunologisch durch Anlagerung spezifischer Antiseren nachzuweisen.

Der Transfer der Proteine erfolgte in einer mit 1x Western-Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol) gefüllten Blot-Apparatur (BioRad) für 1 bis 2,5 h bei 100 V und 4°C. Als Transferkontrolle diente ein gefärbter Protein-Größenstandard, der bei erfolgreichem Transfer aus dem Gel auf die Membran übertragen wurde. Für die folgende Immunodetektion wurde die Membran über Nacht in Blockpuffer (2% Magermilch, 0,05% Tween 20 in PBS-Puffer) bei Zimmertemperatur schüttelnd inkubiert, um unspezifischen Bindestellen abzusättigen. Die Nitrocellulosemembran wurde mit in Kaninchen generierten gegen spezifische halobakterielle Gvp-Proteine gerichteten Antiseren für 1 h bei Zimmertemperatur in einer Verdünnung von 1:1000 in Blocklösung inkubiert. Durch folgendes dreimaliges Waschen (je 10 min, Zimmertemperatur) mit Waschpuffer wurden unspezifisch reagierende Antikörper entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem zweiten Meerrettichperoxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Ig (Amersham Pharmacia, UK) in einer Verdünnung von 1:5000 in Blocklösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit Waschpuffer erfolgte die Immunodetektion mit Hilfe des ECL-Systems von Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers. Das Nachweisverfahren beruht auf der Oxidation von Luminol durch die Meerrettichperoxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Direkt nach der Oxidation befindet sich das Luminol in einem energetisch angeregten Zustand, aus dem es durch Lichtemission in den Grundzustand zurückkehrt. Die Lichtemission kann mit Hilfe eines ECL-Films detektiert werden. Die Exponierung erfolgte je nach Signalstärke für 1 bis 30 min.

In dieser Arbeit verwendetes Antiserum:

Antiserum	verwendet zur Detektion von	Produziert in	Referenz
Anti-cGvpE	cGvpE, pGvpE	Kaninchen	Krüger & Pfeifer, 1996; neu generiert: Scheuch, 2003

3.3.8 Rekombinante Expression und Reinigung von His-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Die rekombinante Expression und Reinigung von Hexahistidin-*tag* (6xHis-*tag*)-Fusionsproteinen aus *E. coli* wurde wie von Peter Zimmermann beschrieben durchgeführt (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Zur rekombinanten Produktion der His-*tag*-Fusionsproteine wurden bereits vorliegende pQE8- und pET28a(+)-Konstrukte verwendet. Das Gasvesikelprotein pGvpH aus *Hbt. salinarum* PHH1 wurde als Fusionsprotein mit einem N-terminalen 6xHis-*tag* in *E. coli* M15 produziert. Das TfbC-Protein aus *Halobacterium salinarum* NRC-1 wurde His-Fusionsprotein mit C-terminalem 6xHis-*tag* in *E. coli* BL21 produziert.

Der Expressionsvektor pQE8 (Qiagen) enthält am 5'-Ende seiner Klonierungsregion eine Sequenz, die für sechs hintereinander liegende Histidine kodiert. Die Inserierung verschiedener Leserahmen als *Bam*HI-*Hind*III-Fragment führt zu einer Fusionierung der Sequenz mit dem Leserahmen. 5' der Klonierungsregion ist der T5-Promotor lokalisiert, der durch zwei *lac*-Operatorsequenzen kontrolliert wird. *E. coli* M15 enthält das Repressorplasmid pREP4 auf dem der *lac*I-Leserahmen lokalisiert ist, was zu einer konstitutiven Produktion von LacI führt. Dies verhindert eine vorzeitige Expression der im pQE8-Vektor inserierten Leserahmen. Die Produktion der 6xHis-*tag*-Fusionsproteine kann gezielt durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden. IPTG ist der Allolactose, dem natürlichen Induktor des *lac*-Operons, strukturell sehr ähnlich und kann somit den *lac*-Repressor binden und die Expression der im pQE8-Vektor enthaltenen Leserahmen ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendetes pQE8-Konstrukt:

p-*gvpH* x pQE8 (A. Hofacker & F. Pfeifer, unveröffentlicht) s. Abschnitt 3.2.4

Der Expressionsvektor pET28a(+) (Novagene) enthält sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende seiner Klonierungsregion eine Sequenz die für sechs Histidine codiert. Die Inserierung eines Leserahmens über die Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen *Nco*I und

XhoI führt zur Fusionierung des Leserahmens mit einer 3'-gelegenen 6xHis-Sequenz. Eine hohe Expressionsrate des His-Fusionsproteins wird durch den T7-Promotor erzielt, der unter Kontrolle einer *lac*-Operator-Sequenz steht. Das *lac*-Repressorprotein ist hierbei direkt auf dem pET28a(+)-Vektor kodiert. Durch Zugabe von IPTG wird die Produktion des His-Fusionsproteins induziert.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendetes pET28a(+)-Konstrukt:

tfbC x pET (Bleholder *et al.*, 2011) s. Abschnitt 3.2.5

Zur Produktion der 6xHis-*tag*-Fusionsproteine wurde *E. coli* M15 mit dem p-gvpH x pQE8 Konstrukt und *E. coli* BL21 mit dem *tfbC* x pET Konstrukt transformiert und in LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Supplementation selektiert. Die Transformanten wurden in 5 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) bei 37°C und 180 upm über Nacht kultiviert, 1:10 in LB-Medium + Antibiotika verdünnt und bis zu einer OD_{600nm} ≤ 0,5 bei 180 upm und 37°C inkubiert. Nach Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Kultur für weitere sechs Stunden schüttelnd inkubiert. und anschließend bei 5000 upm und 4°C für 20 min zum Sedimentieren der Zellen zentrifugiert.

Die 6xHis-*tag*-Proteine wurden per Metallchelate-Affinitätschromatographie über Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) gereinigt. Hierfür wurde das Zellsediment einer 50 ml Kultur in 5 ml Lysepuffer B (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert und die Zellen mittels 5-7 minütiger Ultraschallbehandlung auf Eis (Branson Sonifier 250) aufgeschlossen. Zellmembranen und unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 5000 upm und 4 °C für 20 min von den löslichen Proteinen getrennt. Die Aufreinigung erfolgte bei 20°C im „batch-Verfahren“ mit der löslichen Proteinfraction. Diese wurde mit 1 ml zuvor mit Lysepuffer B äquilibrierter Ni-NTA-Agarose schüttelnd für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Matrix bei 4000 upm für 5 min sedimentiert und der Überstand entfernt. Die Ni-NTA-Agarose mit dem gebundenen His-*tag*-Fusionsprotein wurde viermal für 10 min mit 5 ml Waschpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, 10% Glycerin, 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 6,0) gewaschen um an die Matrix unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der His-*tag*-Fusionsproteine erfolgte durch Zugabe von 2 ml Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, 500 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) und 30 minütiger Inkubation. Es folgten zwei weitere 20 minütige Elutionsschritte mit je 1 ml Elutionspuffer. Der Reinheitsgrad der Elutionsfraktionen wurde per SDS-PAGE und folgender Coomassie-Färbung analysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt. Für Interaktionsstudien wurden die isolierten pGvpH- und

TfbC-His-*tag*-Fusionsproteine jeweils durch schrittweise Dialyse in ihre native Konformation überführt. Die Dialyse erfolgte nach Zimmermann & Pfeifer (2003) bei Zimmertemperatur für je 2 h in Puffern mit 10 mM Tris-HCl pH 7,2, mit sinkender Harnstoff- und steigender Kaliumkonzentration (Dialysepuffer 1: 4 M Harnstoff, 0,8 M KCl; Dialysepuffer 2: 2 M Harnstoff, 1,6 M KCl; Dialysepuffer 3: 2,5 M KCl).

3.3.9 Affinitätschromatographie mit gebundenen His-Proteinen für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Die Affinitätschromatographie zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde wie bereits von Peter Zimmermann beschrieben mit einigen Modifikationen im „*batch*-Verfahren“ durchgeführt (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Für die Interaktionsstudien wurden die rekombinant in *E. coli* M15 oder BL21 produzierten und durch Dialyse in 2,5 M KCl rückgefalteten His-Proteine verwendet. Um eine mit His-Proteinen beladene Affinitätschromatographiematrix herzustellen, wurden 100 µl Ni-NTA-Agarose mit 2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl pH7,2 äquilibriert und mit 20 nmol rückgefaltetem His-Protein für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Matrix mit dem gebundenen His-Protein durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml Waschpuffer 1 (2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl pH7,2) von nicht gebundenen Proteinen gereinigt. Die mit dem His-Protein beladene Matrix wurde für 30 min mit 2,5 mg der löslichen Fraktion des Gesamtproteins einer *Hfx. volcanii*-Transformante inkubiert (siehe Abschnitt 3.3.2 Isolierung von Proteinen aus *Hfx. volcanii* für *in vitro*-Studien). Die folgenden Pufferwechsel erfolgten jeweils durch dreiminütige Sedimentation bei 13300 upm und Entfernen des Überstandes. Im Anschluss wurde die Matrix vier Mal mit 1 ml und zuletzt mit 100 µl Waschpuffer 2 (Waschpuffer 1 + 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Zugabe von Imidazol sollte eine unspezifische Bindung des putativen Interaktionspartners an die Matrix verhindern.

Proteine, die mit dem an die Matrix gebundenem His-Protein interagieren konnten, wurden durch 2 aufeinanderfolgende Elutionsschritte von der Matrix eluiert. Die Elution erfolgte jeweils durch 20 minütige Inkubation der His-Protein-Matrix mit je 100 µl Elutionspuffer (Waschpuffer 1 + 500 mM Imidazol). Jeweils 15 µl des letzten Waschschruttes und der beiden Elutionsfraktionen wurden für Western-Analysen eingesetzt.

4 Ergebnisse

An der GvpE-vermittelten Aktivierung der Promotoren P_{pD} und P_{pA} der p-vac-Region sind je zwei 8 nt lange Bereiche (*GvpE upstream activating sequence*, GvpE-UAS) beteiligt, die angrenzend an das BRE des jeweiligen Promotors lokalisiert sind (Gregor & Pfeifer, 2005; Marschaus 2007; Bauer *et al.*, 2008). Die BR-Elemente und TATA-Boxen beider Promotoren P_{pA} und P_{pD} sind nur durch 35 nt voneinander separiert, daher überlappen sich die distalen Elemente der beiden GvpE-UAS fast vollständig im Zentrum der intergenen Region. Des Weiteren ist GvpE in der Lage *in vitro* mit Komponenten des basalen Transkriptionsapparates (verschiedenen TATA-Box-Bindeproteinen (TBP) und Transkriptionsfaktor B-Proteinen (TFB)) zu interagieren (Teufel & Pfeifer, 2010; Bleiholder *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit sollte näher untersucht werden, auf welche Weise die GvpE-vermittelte Promotoraktivierung auf molekularer Ebene erfolgt. Dafür sollte die Signifikanz der einzelnen 8 nt langen Elemente der beiden GvpE-UAS bei der Aktivierung der Promotoren P_{pA} und P_{pD} definiert und der Einfluss der Promotorelemente und der intergenen Region auf die Promotoraktivitäten analysiert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen GvpE und TFB für eine effiziente GvpE-vermittelte Promotoraktivierung erforderlich ist. Dafür sollten verschieden GvpE-Mutanten, von denen einige infolge der eingeführten Mutationen ihre Aktivatorfunktion verloren haben, auf ihre Interaktionsfähigkeit mit TFB *in vitro* untersucht werden.

4.1 Untersuchung zur Funktion einzelner Elemente der P_{pD} - und P_{pA} -Promotorregion

4.1.1 Substitutionsmutagenese der GvpE-UAS von P_{pA} und P_{pD}

Durch eine 5 bp *scanning* Mutagenese der intergenen Region zwischen den Promotoren P_{pA} und P_{pD} in einem dualen Promotorkonstrukt (Fusion der Promotoren P_{pD} und P_{pA} mit zwei verschiedenen Reportergenen) konnten zwei DNA-Regionen identifiziert werden, die für die GvpE-Aktivierung von Bedeutung sind (Marschaus 2007, Bauer *et al.*, 2008). Jeweils eine dieser Regionen besteht aus zwei je 8 Nukleotid langen Sequenzen, die durch vier nicht an der Aktivierung beteiligten Nukleotide voneinander getrennt sind (Abb. 7). Die eine GvpE-UAS-Region (E-UAS) grenzt bis auf ein Nukleotid an das BR-Element des P_{pA} -Promotors, die andere, für P_{pD} wichtige E-UAS bis auf ein Nukleotid an das BR-Element des P_{pD} -Promotors.

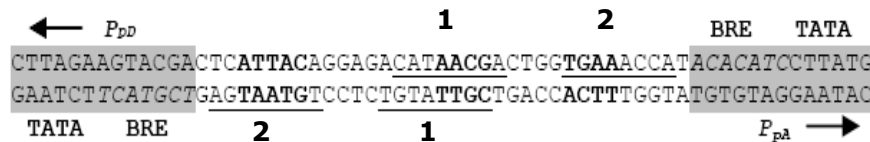


Abb. 7: Sequenz der P_{pD} - P_{pA} -Promotorregion. Die Pfeile geben die Orientierung der Promotoren an. Die TATA-Boxen und BR-Elemente der Promotoren sind grau hinterlegt. Die putativen GvpE-Interaktionsbereiche der Promotoren P_{pD} und P_{pA} sind unterstrichen. Das jeweils distale Element ist mit 1 gekennzeichnet, das jeweils proximale mit 2. Zwischen den vac-Regionen konservierte DNA-Bereiche sind fett gedruckt.

Mutationen im Zentrum der intergenen Region führen zu einer drastischen Reduktion bis hin zum kompletten Verlust der Aktivierbarkeit beider Promotoren. Untersuchungen der P_{pA} -Promotorregion fusioniert mit dem *bgaH*-Leserahmen als Reportergen im P_{pA} -Einzelpromotorkonstrukt zeigen, dass die beiden als putative GvpE-Bindestellen identifizierten DNA-Sequenzen in ihrer Funktion nicht identisch sind (Marschaus, 2007; Bauer *et al.*, 2008).

Ein weiterer Unterschied der Funktion der GvpE-UAS des P_{pA} -Promotors (E-UAS_A) zeigt sich bei Vergleich der Daten: Während die Untersuchungen mit dem dualen P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukt die Wichtigkeit des Zentrums der intergenen Region (und damit beide distalen GvpE-UAS-Elemente) für die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} und P_{pD} zeigt, ist bei Fusion der intergenen Region ohne den zweiten Promotor P_{pD} das distale Element (Element 1) für die P_{pA} -Aktivierung nicht wichtig (Marschaus, 2007; Bauer *et al.*, 2008). Die Daten implizieren eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der Promotoren P_{pD} und P_{pA} , bzw. einen Einfluss von P_{pD} auf die Funktion der E-UAS_A. Um diese Hypothese zu stützen, wurde - angelehnt an die Untersuchungen am P_{pA} -Einzelpromotor - eine Substitutionsmutagenese der E-UAS_A im dualen Promotorkonstrukt durchgeführt und die Promotoraktivität von P_{pA} bzw. P_{pD} jeweils bestimmt.

4.1.1.1 Untersuchung von E-UAS_A im p-gvpD- P_{pD} - P_{pA} -*bgaH*-Konstrukt (pDpA-Konstrukt)

Da die Analyse des dualen P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukts im Vergleich zum P_{pA} -Einzelpromotorkonstrukt unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der Bedeutung des distalen (1) und proximalen Elements (2) der E-UAS_A für die Aktivierung der Genexpression erbracht hat, wurde die Bedeutung der einzelnen Elemente für die pGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} im dualen Promotorkonstrukt untersucht. Hierfür wurde das *bgaH*-Gen aus *Hfx. lucentense* (Holmes *et al.*, 1997; Holmes & Dyall-Smith, 2000) als Reportergen eingesetzt, welches für ein Enzym mit β -Galaktosidase-Aktivität kodiert. Mit Hilfe dieses halobakteriellen Enzyms können Promotoraktivitäten in Halobakterien im

ONPG-Test gemessen werden (Holmes & Dyll-Smith, 2000; Patenge *et al.*, 2000; Gregor & Pfeifer, 2001). Somit kann die P_{pA} -Aktivität indirekt über Quantifizierung der BgaH-Aktivität ermittelt werden. Eine mögliche Auswirkung der in die E-UAS_A eingeführten Mutationen auf den P_{pD} -Promotor wurde dagegen über die p-*gvpD*-Transkriptmengen bestimmt. Die P_{pD} -Promotoraktivität wurde dabei semiquantitativ mittels RNA-Dot-Blot ermittelt.

Für die Herstellung der verschiedenen Promotorkonstrukte wurde zunächst mittels PCR ein Fragment der p-vac-Region amplifiziert, das den p-*gvpD*-Leserahmen und die genauwärts gelegene Region inklusive der Promotoren P_{pD} und P_{pA} und die ersten 18 Nukleotide des p-*gvpA*-Leserahmens umfasst. Die Fusion des Fragmentes mit dem *bgaH*-Reportergen erfolgte innerhalb des p-*gvpA*-Leserahmens (Abb. 8), da eine direkte Fusionierung von Promotoren und *bgaH*-Leserahmen am Startcodon zu Konstrukten führen können, die transkribiert aber nicht translatiert werden (Gregor & Pfeifer, 2001). Das resultierende BgaH-Protein enthielt daher am N-Terminus zusätzlich die ersten 6 Aminosäuren MAQPDS des p-GvpA-Proteins. Aus früheren Experimenten war bereits bekannt, dass die ersten 6 Aminosäuren von p-*gvpA* am N-Terminus die β -Galaktosidase-Aktivität nicht negativ beeinflussen (Sartorius-Neef, 2005).

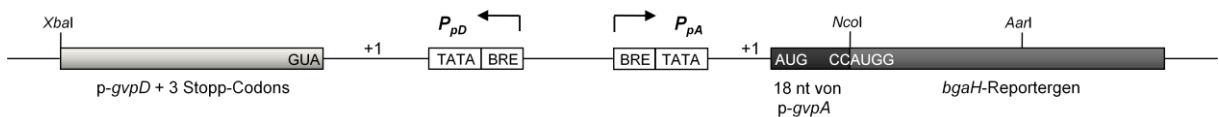


Abb. 8: Schematische Darstellung des p-*gvpD*-pDpA-*bgaH*-Fragments (nicht maßstäblich). Die Pfeile geben die Orientierung der beiden gegenläufigen Promotoren an. Die TATA-Boxen und BR-Elemente der Promotoren sind als Kästen dargestellt. +1 kennzeichnet den jeweiligen Transkriptionsstart.

Das hergestellte p-*gvpD*-pDpA-Fragment wurde als *XbaI*/*NcoI*-Fragment in den Vektor pBIISK+, der bereits den *bgaH*-Leserahmen enthielt, inseriert. Die Korrektheit der Fusion und Sequenz des Konstrukts wurde durch DNA-Sequenzanalysen bestimmt. Um die Produktion des GvpD-Proteins zu verhindern, wurden innerhalb des p-*gvpD*-Leserahmens beginnend mit dem 31. Nukleotid nach Transkriptionsstart mittels ortsspezifischer Mutagenese-PCR drei Stopp-Codons (UGA-Codons) eingeführt. Durch die Unterbindung der Translation der p-*gvpD*-mRNA sollte eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch die repressorische Aktivität von GvpD verhindert werden. GvpD ist ein Repressor der Gasvesikelsynthese (Englert *et al.*, 1992b; Pfeifer *et al.*, 1994; Hofacker *et al.*, 2004) und in der Lage mit GvpE zu interagieren, was zu einer starken Reduktion von GvpE führt (Zimmermann & Pfeifer, 2003; Scheuch & Pfeifer, 2007). Das resultierende pD_{UGAP}A-Konstrukt wurde in den nachfolgenden Versuchen als Wildtyp (pDpA WT) verwendet.

Um die jeweilige Bedeutung des proximalen und distalen Elements der E-UAS_A zu ermitteln, wurden diese DNA-Abschnitte gezielt durch ortsspezifische Mutagenese-PCR - mit pD_{UGAP}A als Matrize - substituiert. Es resultierte jeweils ein Konstrukt mit dem Austausch des proximalen Elements (Element 2) mit der DNA-Sequenz des distalen Elements (Element 1; pA1+1(pDpA)) oder mit einer *nonsense* Sequenz (pA1+Δ2(pDpA); Abb. 9). Desweiteren wurde ein Konstrukt hergestellt in dem die 7 nt des distalen Elements, welche sich mit dem distalen Element der GvpE-UAS des *P_{pD}*-Promotors (E-UAS_D) überlagern, mit einer *nonsense* Sequenz substituiert wurden (pAΔ1+2(pDpA); Abb. 9).

Abb. 9: Sequenzen der P_{PA} -Promotorregion und der drei E-UAS_A-Mutanten. TATA-Box und BRE (kursiv) des P_{PA} -Promotors sind grau hinterlegt. Die putativen GvpE-Interaktionsbereiche von P_{PA} sind unterstrichen. Das distale Element ist mit 1 gekennzeichnet, das proximale mit 2. Die Orientierung der beiden gegenläufigen Promotoren P_{PA} und P_{PD} ist schematischen mit Pfeilen gekennzeichnet Punkte markieren die Nukleotide, die mit der oben angegebenen P_{PA} -Sequenz identisch sind. Die *nonsense* Sequenzen sind fett dargestellt.

Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert und per Restriktionsanalyse bzw. Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit überprüft. Um den Einfluss der Veränderungen der E-UAS_A auf die $P_{\rho A}$ -Aktivität zu untersuchen, wurde die BgaH-Aktivität der einzelnen Transformanten mittels ONPG-Test quantifiziert. Zusätzlich wurden mittels Northern-Analysen die Transkriptmengen der *bgaH*-mRNA bestimmt und mittels sequenzieller

Verdünnung und Dot-Blot-Analysen die *p-gvpD*-mRNA als Maß der P_{pD} -Aktivität in den Transformanten quantifiziert.

Um die Reproduzierbarkeit der ermittelten spezifischen BgaH-Aktivität zu gewährleisten, wurden jeweils zwei bis drei Transformanten mit dem gleichen Konstrukt zwei- bis viermal im ONPG-Test untersucht. Die errechneten spezifischen BgaH-Aktivitäten aller Messreihen wurden gemittelt und als Maß für die Streuung die entsprechenden Standardabweichungen bestimmt. Für die Reproduzierbarkeit der ermittelten *p-gvpD*-Transkriptmengen wurde aus jeweils zwei Transformanten die Gesamt-RNA isoliert und mittels RNA-Dot-Blot untersucht. Da die Promotoraktivität beider Promotoren P_{pD} und P_{pA} zum selben Zeitpunkt untersucht werden sollte, erfolgte die Entnahme der Zellen für den ONPG-Test und für die RNA-Isolierung aus derselben Kultur.

Analyse der basalen und GvpE-induzierten P_{pA} -Promotoraktivität in E-UAS_A-Varianten im pDpA-Konstrukt

Für die Ermittlung der Basalaktivität des Promotors P_{pA} wurden *Hfx. volcanii* WFD11-Zellen mit dem entsprechenden P_{pA} -E-UAS_{Mut}-Konstrukt in pWL102 und dem Vektor pJAS35 transformiert. Für die Untersuchung der Aktivierbarkeit der unterschiedlichen E-UAS_A-Mutanten durch GvpE wurden *Hfx. volcanii* WFD11-Zellen mit dem entsprechenden P_{pA} -E-UAS_{Mut}-Konstrukt in pWL102 und dem pE^{ex}-Konstrukt transformiert.

Das Wachstum der jeweiligen P_{pA} -E-UAS_{Mut}+pJAS und P_{pA} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex} Doppel-Transformanten wurde durch Messung der OD_{600nm} über 72 h verfolgt. Anhand der ermittelten Werte wurden die in Abbildung 10 dargestellten Wachstumskurven erstellt. Im Vergleich zu pDpA WT zeigten alle drei E-UAS_A-Mutanten ein ähnliches Wachstum.

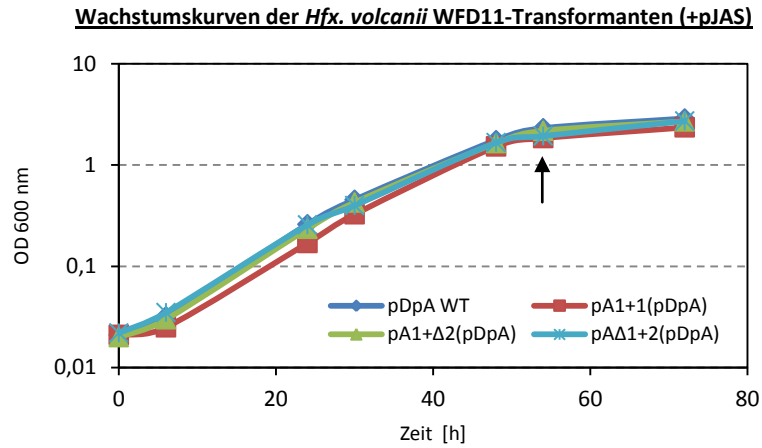
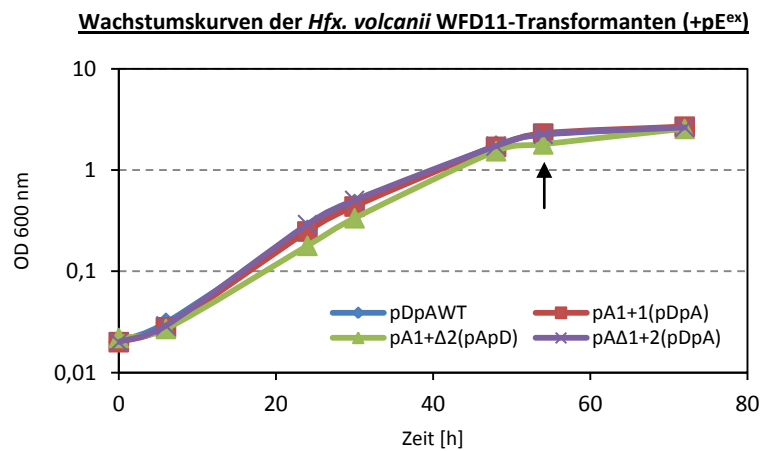
A**B**

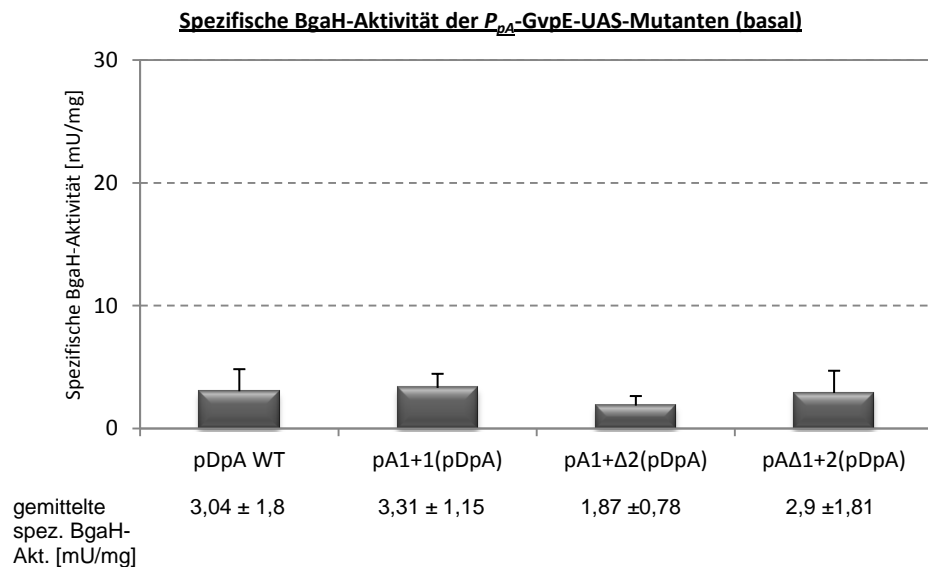
Abb. 10: Wachstumskurven der *Hfx. volcanii* Doppeltransformanten die das pDpA WT- oder die P_{pA} -E-UAS_{Mut}-Konstrukte und **(A)** den pJAS35-Vektor oder **(B)** das pE^{ex}-Konstrukt enthielten. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Probenentnahme zur Bestimmung der BgaH-Aktivität mittels ONPG-Test, der Gesamtproteinkonzentration und zur Isolierung der Gesamt-RNA und Plasmid-DNA.

Um die Aktivität von P_{pA} in den verschiedenen Transformanten untereinander vergleichen zu können, wurden von diesen Kulturen in der frühen stationären Wachstumsphase (nach 54 h) Proben zur Bestimmung der BgaH-Aktivität mittels ONPG-Test und Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels Bradford-Analyse entnommen. Für die pDpA WT+pJAS-Transformante wurde eine spezifische Aktivität von $3 \pm 1,8$ mU/mg bestimmt (Abb. 11 A). In den Zelllysaten der pA1+1(pDpA)+, pA1+Δ2(pDpA)+ und pAΔ1+2(pDpA)+pJAS-Transformanten konnten spezifische Aktivitäten in der gleichen Größenordnung ermittelt werden (Abb. 11 A). Die Untersuchungen zeigten, dass die in die P_{pA} -E-UAS eingeführten Modifikationen die basale Aktivität des P_{pA} -Promotors nicht beeinflussten.

Die gemittelte spezifische BgaH-Aktivität für die GvpE-induzierte P_{pA} -Promotoraktivität der pDpA WT+pE^{ex}-Transformante lag bei 207 ± 36 mU/mg. Bei der pA1+1(pDpA)+pE^{ex}-

Transformante war die spezifische Aktivität durchschnittlich 1,5fach geringer und lag bei 136 ± 37 mU/mg (Abb. 11 B). Bei der $pA1+\Delta 2(pDpA)+pE^{ex}$ -Transformante war die spezifische Aktivität im Mittel 41fach niedriger im Vergleich zum Wildtyp und lag bei 5 ± 2 mU/mg (Abb. 11 B). Bei der $pA\Delta 1+2(pDpA)+pE^{ex}$ -Transformante lag die spezifische Aktivität durchschnittlich bei 9 ± 3 mU/mg und war 23fach niedriger als die ermittelte Wildtyp-Aktivität (Abb. 11 B). Somit wurde in den $E-UAS_A$ -Mutanten $pA1+\Delta 2(pDpA)+pE^{ex}$ und $pA\Delta 1+2(pDpA)+pE^{ex}$ in Gegenwart von GvpE keine Stimulierung des P_{pA} -Promotors erreicht.

A



B

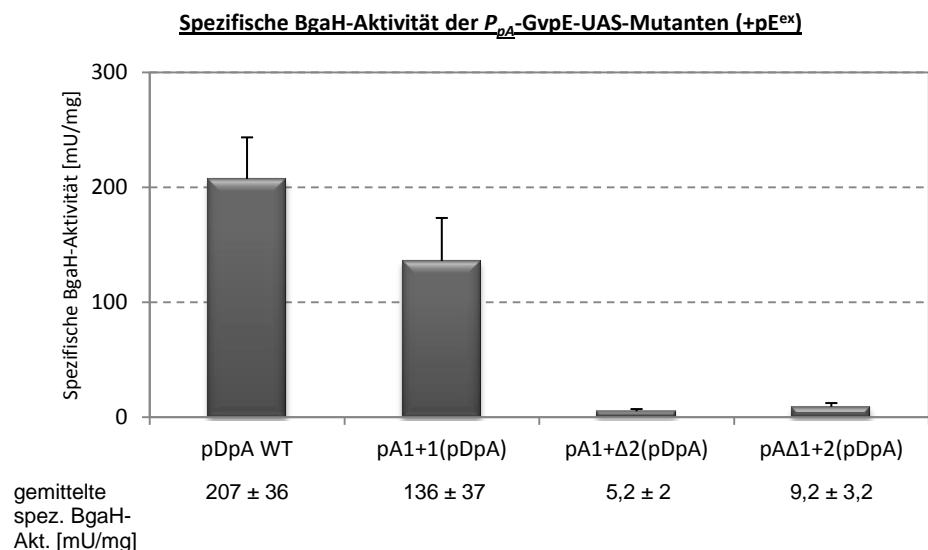


Abb. 11: Spezifische BgaH-Aktivität des pDpA WT und der $E-UAS_A$ -Mutanten nach 54 h Wachstum. Die spezifische BgaH-Aktivität wurde als Maß für die P_{pA} -Aktivität mittels ONPG-Test und Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration ermittelt.

A: Basalaktivität von P_{pA} im pDpA WT+pJAS und in den P_{pA} - $E-UAS_{Mut}$ +pJAS-Doppeltransformanten.
B: GvpE-induzierte Aktivität von P_{pA} im pDpA WT+pE^{ex} und in den P_{pA} - $E-UAS_{Mut}$ +pE^{ex}-Doppeltransformanten.

Um die Ergebnisse zu verifizieren und um ausschließen zu können, dass die Unterschiede in den BgaH-Aktivitäten Veränderungen in der Translation widerspiegeln, wurde zusätzlich die Expression des *bgaH*-Leserahmens bei den unterschiedlichen Transformanten auf mRNA-Ebene untersucht. Die gebildeten *bgaH*-Transkriptmengen wurden anschließend mit den ermittelten spezifischen BgaH-Aktivitäten verglichen. Es wurde die Gesamt-RNA aus den Transformaten isoliert und jeweils 2 µg in Northern-Analysen eingesetzt. Für die Detektion der *bgaH*-mRNA wurde eine strangspezifische DIG-markierte *bgaH*-Sonde verwendet. Anhand der mit Methylenblau angefärbten 16S und 23S rRNA wurde die Qualität und Menge der aufgetragenen RNA verglichen.

In der Northern-Analyse der pDpA WT+pJAS und P_{pA} -E-UAS_{Mut}+pJAS-Transformanten konnte die 2,2 kb lange *bgaH*-mRNA und deren kürzere Abbauprodukte in allen Transformanten in ähnlicher Menge detektiert werden (Abb. 12 A). Bei allen Transformanten wurde eine kürzere mRNA mit einer Länge von 1,5 kb detektiert. Sie entstand möglicherweise durch vorzeitige Termination, gelegentlich vorkommende Kreuzhybridisierung der *bgaH*-Sonde mit der 16S rRNA oder es könnte sich auch um ein Abbauprodukt handeln (Holmes & Dyall-Smith, 2000). Das Transkriptionsmuster entsprach den ermittelten BgaH-Aktivitäten.

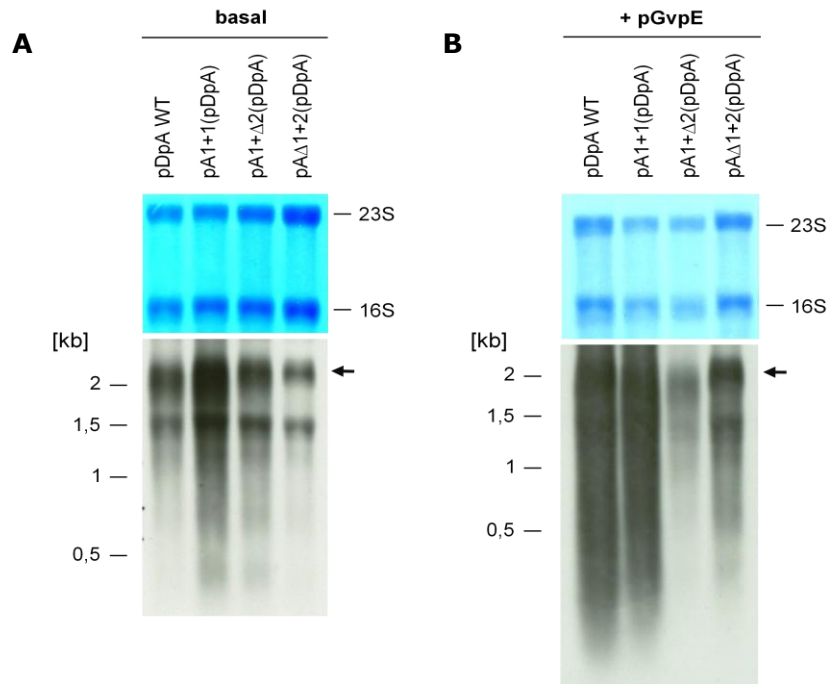


Abb. 12: Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA in den *Hfx. volcanii* Doppeltransformanten, die das pDpA WT-Konstrukt oder die P_{pA} -E-UAS_{Mut}-Konstrukte und **(A)** pJAS35 oder **(B)** pE^{ex} enthielten. Die Methyleneblau-gefärbte Nylonmembran darüber zeigt die 16S und 23S rRNA und diente dem Vergleich der Qualität und Menge der aufgetragenen Gesamt-RNA. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Angabe der RNA-Größenstandards in kb jeweils auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

In der Northern-Analyse zur Untersuchung der pGvpE-vermittelten P_{pA} -Aktivität konnte die 2,2 kb lange *bgaH*-mRNA (und deren kürzere Abbauprodukte) ebenfalls in allen Transformanten detektiert werden (Abb. 12 B). Den Ergebnissen des ONPG-Tests entsprechend wurde bei der pDpA WT+pE^{ex}-Transformante die größte Transkriptmenge detektiert. Die pA1+1(pDpA)+pE^{ex}-Transformante bildete im Vergleich zum Wildtyp etwas weniger *bgaH*-mRNA. Auf der Methyleneblau-gefärbten Nylonmembran erkannte man, dass von der Transformante pA1+1(pDpA)+pE^{ex} etwas weniger Gesamt-RNA aufgetragen wurde. Bezieht man diese Schwankungen mit ein, ist der Unterschied zwischen pDpA WT+pE^{ex} und pA1+1(pDpA)+pE^{ex} in der Transkriptmenge nicht so ausgeprägt wie die im ONPG-Test ermittelten spezifischen BgaH-Aktivitäten. Dies könnte darin begründet sein, dass die Northern-Analyse exemplarisch für eine Transformante pro Konstrukt durchgeführt wurde, wohingegen die spezifische BgaH-Aktivität aus mehreren Messungen pro Transformante und Konstrukt gemittelt wurde. Die Standardabweichungen verdeutlichen die Schwankungen der BgaH-Aktivitäten in den einzelnen Messungen. Die Gesamt-RNA wurde aus Transformanten isoliert, bei denen die spezifische Aktivität jeweils am äußeren Bereich der Standardabweichung lag (pDpA

WT+pE^{ex}: 160 mU/mg, pA1+1(pDpA)+pE^{ex}: 123 mU/mg). Man kann daher annehmen, dass die Menge der Transkripte generell vergleichbar mit den ermittelten BgaH-Aktivitäten sind. Bei den Transformanten pA1+Δ2(pDpA)+pE^{ex} und pAΔ1+2(pDpA)+pE^{ex} wurden geringere *bgaH*-Transkriptmengen detektiert. Bezieht man die Konzentrations-Schwankungen der aufgetragenen Gesamt-RNAs mit ein, bildeten die Transformanten pA1+Δ2(pDpA)+pE^{ex} und pAΔ1+2(pDpA)+pE^{ex} annähernd gleiche Mengen des *bgaH*-Transkripts.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Verwendung der gleichen Sequenz des distalen Elements 1 an Position 1+2 in der Mutante pA1+1(pDpA) als auch die Substitution des Elements 2 bzw. 1 mit einer *nonsense* Sequenz in pA1+Δ2(pDpA) bzw. pAΔ1+2(pDpA) die P_{pA} -Aktivierung durch GvpE behinderte, da in beiden Mutanten weniger *bgaH*-Transkripte und BgaH-Protein gebildet wurden. Die unterschiedlichen BgaH-Aktivitäten sind daher auf eine reduzierte Transkription an P_{pA} und nicht auf Probleme bei der Translation zurückzuführen.

Analyse der basalen und GvpE-induzierten P_{pD} -Promotoraktivität in E-UAS_A-Varianten im pDpA-Konstrukt

Zur semiquantitativen Bestimmung der Basalaktivität des P_{pD} -Promotors in diesem dualen P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukt wurden mit der isolierten Gesamt-RNA Dot-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde jeweils 2 µg Gesamt-RNA 1:1 bis zu einer Endkonzentration von $3,9 \times 10^{-3}$ seriell verdünnt. Als Kontrolle wurde die Gesamt-RNA aus einer *Hfx. volcanii* WFD11-Transformante gewählt, die die Vektoren pWL102 (ohne inserierten Leserahmen) und pJAS35 enthielt (pWL/pJAS). Nach dem Transfer der seriell verdünnte Gesamt-RNA der jeweiligen Transformanten auf eine Nylonmembran wurde diese mit Methylenblau angefärbt. So konnte gezeigt werden, dass von allen Transformanten ähnliche Mengen an Gesamt-RNA aufgetragen wurden (Abb. 13). Die Detektion der p-*gvpD*-mRNA erfolgte mit einer strangspezifischen DIG-markierten RNA-Sonde. Die p-*gvpD*-Sonde hybridisierte mit der mRNA aus der pWL/pJAS-Transformante bis zu einer RNA-Konzentration von 0,25 µg (Abb. 13). Nach Abzug der Hintergrund-Hybridisierung lässt sich vermuten, dass im Vergleich zum Wildtyp keine Mutante eine veränderte P_{pD} -Basalaktivität besaß (Abb. 13). Der in Abb. 13 dargestellte RNA-Dot-Blot steht exemplarisch für die durchgeführten Untersuchungen zur Ermittlung der p-*gvpD*-Transkriptmengen der E-UAS_A-Mutanten. Die RNA-Dot-Blot-Analyse mit der Gesamt-RNA aus der jeweils zweiten Transformante mit dem gleichen Konstrukt erbrachte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

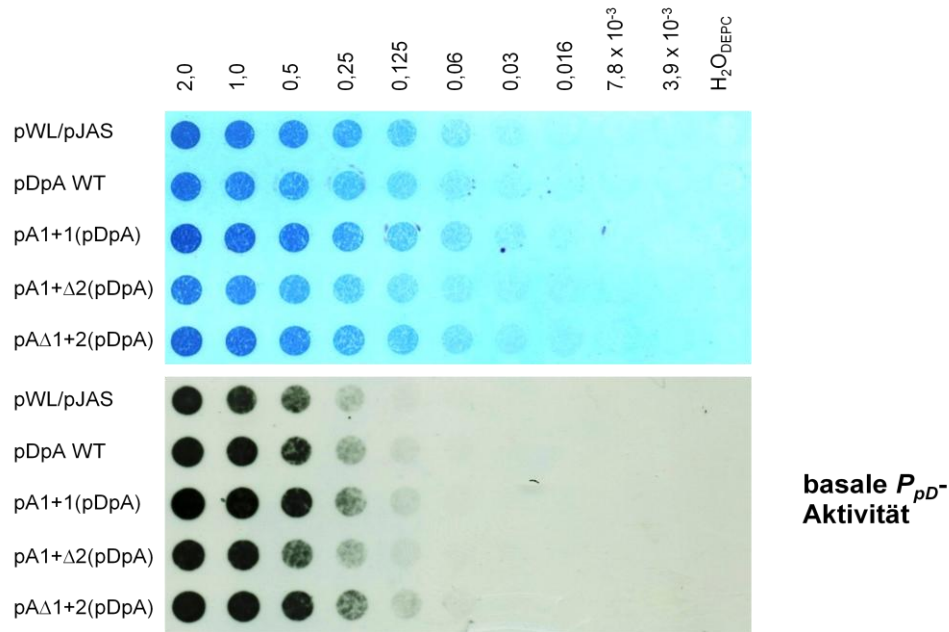


Abb. 13: Dot-Blot-Analyse zur Detektion der *p-gvpD*-mRNA in den *Hfx. volcanii* Doppel-Transformanten, die das pDpA WT-, pA1+1(pDpA)-, pA1+Δ2(pDpA)- oder pAΔ1+2(pDpA)-Konstrukt und den pJAS35-Vektor enthielten. Als Negativkontrolle (=pWL/pJAS) wurde die Gesamt-RNA aus einer pWL102+pJAS35-Doppeltransformante verwendet. Die Gesamt-RNA aus den Transformanten wurde seriell 1:1 verdünnt und mit einer DIG-markierten, *p-gvpD*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Die Methylenblaufärbung oben diente dem Mengenvergleich der aufgetragenen Gesamt-RNA. Die RNA-Konzentrationen sind in µg darüber angegeben.

Zur semiquantitativen Bestimmung der pGvpE-vermittelten Aktivität von P_{pD} wurde jeweils 0,25 µg Gesamt-RNA vom Wildtyp und der drei E-UAS_A-Mutanten im P_{pD} - P_{pA} -Konstrukt 1:1 bis zu einer Endkonzentration von $1,9 \times 10^{-3}$ seriell verdünnt. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte, dass von allen Transformanten ähnliche Mengen an Gesamt-RNA aufgetragen wurden (Abb. 14). Mit der Gesamt-RNA aus der pWL/pJAS-Transformante kam es bis zu einer RNA-Konzentration von 0,06 µg zu einer Hybridisierung der *p-gvpD*-Sonde (Abb. 14). Die *p-gvpD*-mRNA konnte in allen Transformanten detektiert werden (Abb. 14). Nach Abzug der Hintergrund-Hybridisierung wurden für die Transformanten pA1+1(pDpA)+pE^{ex} und pA1+Δ2(pDpA)+pE^{ex} im Vergleich zum pDpA WT+pE^{ex} in etwa gleiche Mengen an *p-gvpD*-Transkripten detektiert. Bei der Transformante pAΔ1+2(pDpA)+pE^{ex} wurde im Vergleich zum Wildtyp+pE^{ex} eine ca. 4fach geringere Menge an *bgaH*-mRNA detektiert. Dieses Ergebnis stimmt gut mit früheren Untersuchungen überein. Diese zeigten, dass Mutationen im zentralen Bereich der intergenen Region die GvpE-vermittelte Aktivierung beider Promotoren P_{pD} und P_{pA} beeinflussen (Marschhaus 2007, Bauer *et al.*, 2008). Der Vergleich der *p-gvpD*-Transkriptmengen zwischen den zwei Transformanten mit gleichem Konstrukt erbrachte das gleiche Transkriptionsmuster (Daten nicht gezeigt).

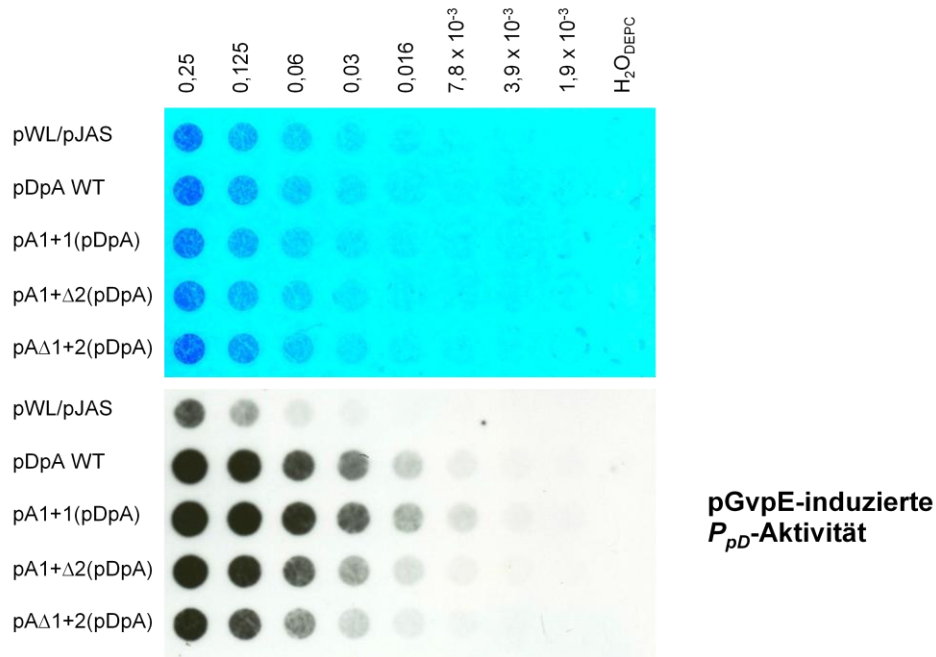


Abb. 14: Dot-Blot-Analyse zur Detektion der *p-gvpD*-mRNA in den *Hfx. volcanii* Doppel-Transformanten, die das pDpA WT-, pA1+1(pDpA)-, pA1+Δ2(pDpA)- oder pAΔ1+2(pDpA)-Konstrukt und pE^{ex} enthielten. Als Negativkontrolle (=pWL/pJAS) wurde die Gesamt-RNA aus einer pWL102+pJAS35-Doppeltransformante verwendet. Die Gesamt-RNA aus den Transformanten wurde seriell 1:1 verdünnt und mit einer DIG-markierten, *p-gvpD*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Die Methylenblaufärbung oben diente dem Mengenvergleich der aufgetragenen Gesamt-RNA. Die RNA-Konzentrationen sind in μg darüber angegeben.

Fasst man die Ergebnisse der ONPG-Tests und die dargestellten RNA-Analysen zusammen, zeigte sich, dass alle in die P_{pA} -GvpE-UAS eingeführten Modifikationen – Verwendung der gleichen Sequenz (aus proximalem wird distales Element) oder Substitution des distalen bzw. proximalen Elements mit einer *nonsense* Sequenz – zu einer Beeinträchtigung der GvpE-vermittelten Promotoraktivierung von P_{pA} führten. Des Weiteren führte die Substitution des distalen Elements mit einer *nonsense* Sequenz in pAΔ1+2(pDpA) ebenfalls zu einer starken Reduktion der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pD} .

Der Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen früherer Analysen (Substitutionsmutagenese Einzelpromotor, Tabelle 2) impliziert eine unterschiedliche Funktion des distalen E-UAS_A-Elements für die Aktivierung von P_{pA} durch GvpE im dualen Promotorkonstrukt. Für die Aktivierung des P_{pA} -Promotors im Einzelpromotorkonstrukt ist das distale Element nicht notwendig (Marschhaus 2007, Bauer *et al.*, 2008) wohingegen die Substitution dieses Elements mit einer *nonsense* Sequenz im dualen Promotorkonstrukt zum Verlust der GvpE-vermittelten Aktivierung führte.

Tabelle 2: Spezifische BgaH-Aktivitäten mit Standardabweichungen in [mU/mg] in den *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten pDpA WT+pJAS** bzw. pA-*bgaH*+pJAS* und P_{pA} -E-UAS_{Mut}+pJAS*/** (basal) und pDpA WT+pE^{ex} bzw. pA-*bgaH*+pE^{ex}* und P_{pA} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex}*/** (aktiviert).

Transformante	P_{pA}-Aktivität im Einzel-promotorkonstrukt*		P_{pA}-Aktivität im dualen Promotorkonstrukt pDpA **	
	basal	+pE ^{ex}	basal	+pE ^{ex}
WT	1,1 ± 0,5	173 ± 51	3 ± 1,8	207 ± 36
pA1+1	2,5 ± 0,3	71 ± 7	3,3 ± 1,2	136 ± 37
pA1+Δ2	0,3 ± 0,5	2,5 ± 1,9	1,9 ± 0,8	5,2 ± 2
pAΔ1+2	1,3 ± 1	178 ± 44	2,9 ± 1,8	9,2 ± 3,2

* (Marschaus, 2007, Bauer *et al.*, 2008)

** diese Arbeit

4.1.1.2 Untersuchungen an der GvpE-UAS des P_{pD} -Promotors

Das proximale und distale Element der P_{pA} -GvpE-UAS haben offenbar eine unterschiedliche Bedeutung für die GvpE-Aktivierung des P_{pA} -Promotors (Bauer *et al.*, 2008). Das distale Element der P_{pA} -GvpE-UAS überlappt fast vollständig mit dem distalen Element der P_{pD} -GvpE-UAS im Zentrum der intergenen Region. Das warf die Frage auf, ob sich das distale Element der E-UAS_D ebenfalls funktionell von dem proximalen Element der E-UAS_D-unterscheidet. Zur Klärung dieser Frage und zur näheren Charakterisierung der P_{pD} -GvpE-UAS-Elemente wurde eine Substitutions-Mutagenese der E-UAS_D durchgeführt. Um etwaige Unterschiede in der Funktion der putativen GvpE-Bindestelle vor P_{pD} bei Anwesenheit einer funktionalen P_{pA} -Promotorregion zu ermitteln, wurden die Substitutions-Mutagenese sowohl im Einzel- als auch in einem dualen Promotorkonstrukt durchgeführt. Das Maß der Basalaktivität und der GvpE-induzierten Aktivierbarkeit der mutierten P_{pD} -Promotoren wurde mit dem BgaH-Reportersystem (Holmes *et al.*, 1997; Holmes & Dyall-Smith, 2000) im ONPG-Test untersucht. Die Ermittlung der Basal- und GvpE-stimulierten Aktivität des im dualen Promotorkonstrukt vorhandenen P_{pA} -Promotors erfolgte über die Quantifizierung der p-*gvpA*-mRNA mittels Dot-Blot-Analysen.

Substitutionsmutagenese der P_{pD} -GvpE-UAS-Region im P_{pD} -Einzelpromotorkonstrukt

Für die Herstellung der verschiedenen P_{pD} -E-UAS Mutanten wurden die beiden Elemente der putativen GvpE-Binderegion gezielt durch ortsspezifische Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize diente das vorhandene pD WT-Konstrukt in pBSKII+ (Bauer 2006, Bauer *et al.*, 2008). Es wurden jeweils eine der beiden putativen GvpE-

Interaktionselemente mit der DNA-Sequenz der anderen proximal, bzw. distal dazu gelegenen GvpE-Binderegion (pD1+1, pD2+2) oder einer *nonsense* Sequenz (pD1+Δ2, pDΔ1+2) substituiert (Abb. 15).

	1	2	BRE	TATA	
P_{pD}	ATGGTTTCACCA	GC	TCGTTATG	TCCTGTAATGAG	<u>TCG</u> TACTTCTAAG— <i>bgaH</i>
pD1+1	CGTTATGT		
pD2+2	TGTAATGA		
pD1+Δ2	GTCTGATT		
pDΔ1+2	GTCTCACC		

Abb. 15: Sequenzen der P_{pD} -Promotorregion und der vier P_{pD} -E-UAS-Mutanten. TATA-Box und BRE (kursiv) des P_{pD} -Promotors sind grau hinterlegt. Die putativen GvpE-Interaktionsbereiche von P_{pD} sind unterstrichen. Das distale Element ist mit 1 gekennzeichnet, das proximale mit 2. Punkte markieren die Nukleotide, die mit der oben angegebenen P_{pD} -Sequenz identisch sind. Die *nonsense* Sequenzen sind fett dargestellt.

Der Erfolg der PCR wurde durch DNA-Sequenzanalysen überprüft. Anschließend wurde die Sequenz als komplettes Fusionskonstrukt in den halobakteriellen Vektor pWL102 inseriert. Die jeweiligen Konstrukte (pD WT, pD1+1, pD2+2, pD1+Δ2 und pDΔ1+2) wurden zur Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11 verwendet. Zur Untersuchung der basalen Promotoraktivität erfolgte die Doppeltransformation von *Hfx. volcanii* mit dem entsprechenden P_{pD} -E-UAS_{Mut}-*bgaH*-Konstrukt und dem halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. Die Aktivierbarkeit der verschiedenen P_{pD} -E-UAS_{Mut}-*bgaH*-Konstrukte durch pGvpE wurde durch die Transformation von *Hfx. volcanii* mit dem entsprechenden P_{pD} Promotor-Konstrukt in pWL102 und pE^{ex} analysiert. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert und per Restriktions- oder Southern-Analysen auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Produktion von pGvpE in den verschiedenen P_{pD} -E-UAS_{Mut}-*bgaH*+pE^{ex}-Transformanten wurde mittels Western-Blot mit einem spezifischen cGvpE-Antiserum kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Für die Ermittlung der spezifischen BgaH-Aktivitäten wurden die Zelllysate von jeweils zwei bis drei Transformanten des gleichen Konstrukts jeweils zweimal mittels ONPG-Test analysiert.

Analyse der basalen P_{pD} -Promotoraktivität im P_{pD} -Promotorkonstrukt

Für die Bestimmung der Basalaktivität von P_{pD} anhand der BgaH-Aktivität wurden zunächst die P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pJAS Transformanten untersucht. Das Wachstum der jeweiligen Transformanten wurde durch Messung der OD_{600nm} über 72 h verfolgt. Alle Transformanten zeigten ein ähnliches Wachstum (Daten nicht gezeigt).

Nach 54 h Wachstum wurde in der frühstationären Wachstumsphase die spezifische BgaH-Aktivität der Transformanten bestimmt. Für den WT (pD WT+pJAS) wurde eine durchschnittliche spezifische Aktivität von $3 \pm 1,8$ bestimmt (Abb. 16 A). Die spezifischen Aktivitäten der E-UAS_D-Mutanten pD1+1+pJAS, pD2+2+pJAS und pDΔ1+2+pJAS lagen in der gleichen Größenordnung wie die des Wildtyps (Abb. 16 A). Für die Transformante pD1+Δ2+pJAS wurde mit $12,7 \pm 4$ mU/mg eine im Vergleich zum Wildtyp +pJAS leicht erhöhte spezifische BgaH-Aktivität ermittelt (Abb. 16 A). Die Untersuchungen zeigten, dass die in die E-UAS_D eingeführten Substitutionen die basale Aktivität des Promotors P_{pD} nicht beeinflussten. Um die Expression des *bgaH*-Leserahmens in den verschiedenen Transformanten auf mRNA-Ebene zu untersuchen und mit den gemessenen spezifischen BgaH-Aktivitäten zu vergleichen, wurden die jeweilig gebildeten *bgaH*-Transkriptmengen im Northern-Blot analysiert. Dafür wurden zeitgleich zur Probenentnahme zur Bestimmung der BgaH-Aktivität Proben für die Isolierung der Gesamt-RNA entnommen. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte die Qualität der einzelnen RNA-Präparationen und ermöglichte einen Vergleich der aufgetragenen RNA-Konzentrationen. Die Detektion der 2,2 kb großen *bgaH*-mRNA und deren Abbauprodukte erfolgten durch eine strangspezifische *bgaH*-Sonde. Wie anhand der Negativkontrolle zu sehen kam es zu einer Hybridisierung der Sonde mit der 16S und 23S rRNA (Abb. 16 B). Es wurden von den Transformanten pD WT+pJAS, pD1+1+pJAS, pD2+2+pJAS, pD1+Δ2+pJAS und pDΔ1+2+pJAS ähnliche *bgaH*-Transkriptmengen gebildet (Abb. 16 B). Die Northern-Analyse zeigte ebenso wie der ONPG-Test, dass keine der eingeführten Modifikationen die basale P_{pD} -Aktivität beeinträchtigte.

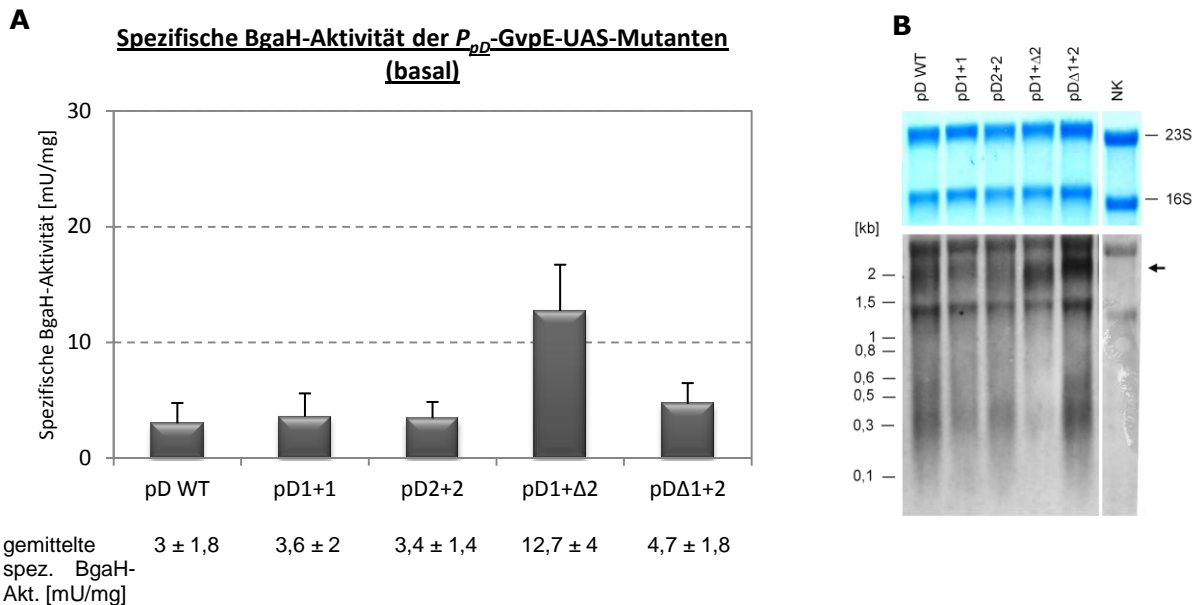


Abb. 16: A) Spezifische BgaH-Aktivitäten sowie **B)** *bgaH*-Transkriptmengen des pD WT+pJAS und der entsprechenden P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pJAS-Transformanten.

A) Die spezifischen BgaH-Aktivitäten wurden nach 54 h Wachstum als Maß für die P_{pD} -Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt.

B) Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA. Die dazugehörige Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methylenblau ist darüber gezeigt. NK=Negativkontrolle (Gesamt-RNA aus *Hfx. volcanii* pJAS/pWL-Transformante). Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Angabe der RNA-Größenstandards in kb auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

Analyse der pGvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivität im P_{pD} -Promotorkonstrukt

Die Ermittlung der spezifischen BgaH-Aktivitäten der verschiedenen P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex}-Transformanten mittels ONPG-Test erfolgte nach 54 h Wachstum. Das Wachstum jeder Transformante wurde über 72 h verfolgt. Alle Transformanten zeigten ein ähnliches Wachstum (Daten nicht gezeigt).

Bei der Analyse des Einflusses der eingeführten Mutationen auf die Aktivierbarkeit von P_{pD} durch GvpE zeigte von den vier E-UAS_D-Mutante einzig pD2+2+pE^{ex} eine Stimulierung der P_{pD} -Promotoraktivität durch Anwesenheit von GvpE (Abb. 17 A). Die spezifische BgaH-Aktivität dieser Transformante (60 ± 5 mU/mg) lag in der Größenordnung der spezifischen BgaH-Aktivität des pD WT+pE^{ex} (68 ± 21 mU/mg, Abb. 17 A). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Transformante pD1+1+pE^{ex} eine 11fach, pD1+Δ2+pE^{ex} eine 6fach und die Transformante pDΔ1+2+pE^{ex} eine 12fach reduzierte BgaH-Aktivität (Abb. 17 A). Die jeweilige P_{pD} -Aktivität dieser drei Transformanten lag in der Größenordnung der für diese Konstrukte ermittelten P_{pD} -Basalaktivität (Abb. 16 A). Das ließ vermuten, dass die hier eingeführten Mutationen eine Aktivierung des P_{pD} -Promotors durch den Transkriptionsaktivator GvpE verhinderten.

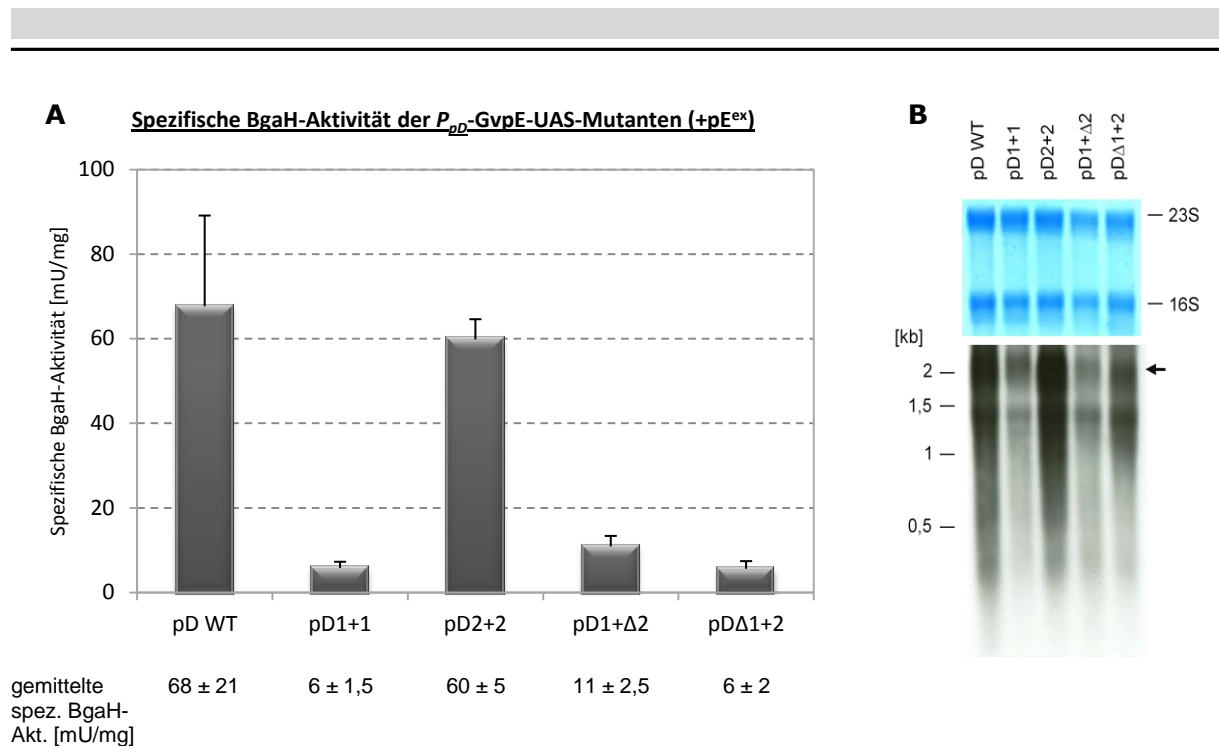


Abb. 17: **A)** Spezifische BgaH-Aktivitäten sowie **B)** *bgaH*-Transkriptmengen des pD WT+pE^{ex} und der entsprechenden P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex}-Transformanten.

A) Die spezifischen BgaH-Aktivitäten wurden nach 54 h Wachstum als Maß für die P_{pD} -Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt.

B) Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA. Die dazugehörige Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methylenblau ist darüber gezeigt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Angabe der RNA-Größenstandards in kb auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

Zur Bestimmung der *bgaH*-Transkriptmenge in den verschiedenen Transformanten wurden zeitgleich zur Probenentnahme für den ONPG-Test Proben für die Isolierung der Gesamt-RNA entnommen. Durch Anfärben der Nylonmembran mit Methylenblau wurde die 16S und 23S rRNA sichtbar gemacht, anhand derer die Qualität und Menge der einzelnen RNA-Präparationen verglichen wurde (Abb. 17 B). Mit einer strangspezifischen *bgaH*-Sonde konnte die 2,2 kb lange mRNA und deren kürzere Abbauprodukte in allen Transformanten detektiert werden (Abb. 17 B).

Den ermittelten BgaH-Aktivitäten entsprechend wurden bei den Transformanten pD WT+pE^{ex} und pD2+2+pE^{ex} die stärksten Signale der *bgaH*-mRNA detektiert. Im Vergleich zum Wildtyp waren die *bgaH*-Transkriptmengen in den E-UAS_D-Mutanten pD1+1+pE^{ex}, pD1+Δ2+pE^{ex} und pDΔ1+2+pE^{ex} dagegen deutlich verringert. Wegen der geringen Mengen an *bgaH*-mRNA in diesen Transformanten wurde vermutet, dass die eingeführten Mutationen die Stimulierung des Promotors P_{pD} durch GvpE tatsächlich behinderten. Die verringerte BgaH-Aktivität der Transformanten pD1+1+pE^{ex}, pD1+Δ2+pE^{ex} und pDΔ1+2+pE^{ex} war demnach nicht auf Veränderungen auf der Translationsebene zurückzuführen.

Substitutionsmutagenese der P_{pD} -GvpE-UAS-Region im $bgaH$ - P_{pD} - P_{pA} -p-gvpA-Konstrukt (pApD-Konstrukt)

Die räumliche Nähe der beiden divergenten Promotoren P_{pD} und P_{pA} sowie die divergenten Ergebnisse der Mutagenesen an P_{pA} im Einzel- und dualen Promotorkonstrukt lassen eine gegenseitige Beeinflussung der Promotoren P_{pD} und P_{pA} vermuten. Um einen möglichen Einfluss des P_{pA} -Promotors auf die GvpE-Interaktion mit den Elementen der P_{pD} -GvpE-UAS zu ermitteln, wurde die Substitutionsmutagenese der E-UAS_D vergleichend auch in einem dualen Promotorkonstrukt (Abb. 18) durchgeführt. Dafür wurde der Effekt der eingeführten Mutationen auf die GvpE-vermittelte P_{pD} -Aktivierung mit Hilfe des *BgaH*-Reportersystems im ONPG-Test untersucht. Zusätzlich wurden mittels Northern-Analysen die Transkriptmengen der *bgaH*-mRNA und mittels Dot-Blot-Analysen die der p-gvpA-mRNA als Maß der P_{pA} -Aktivität in den Transformanten bestimmt.

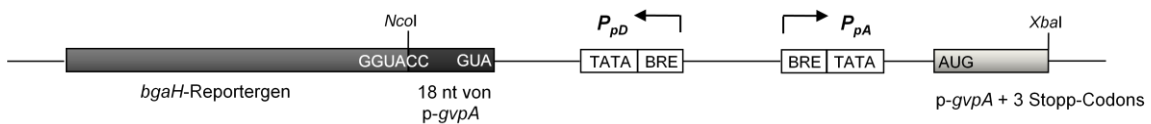


Abb. 18: Schematische Darstellung des pApD WT-Fragments (nicht maßstäblich). Die Pfeile geben die Orientierung der Promotoren an. Die TATA-Boxen und BR-Elemente der Promotoren sind als Kästen mit TATA bzw. BRE dargestellt (in Bauer *et al.*, 2008 als pA-pD_{UGA} publiziert).

Für die Herstellung der verschiedenen E-UAS_D-Mutanten wurden die beiden Elemente der putativen GvpE-Binderegion gezielt durch ortsspezifische Mutagenese-PCR substituiert. Als Matrize diente das vorhandene pApD WT-Fragment in pBSKII+ (Abb. 18; als pA-pD_{UGA} in Bauer *et al.*, 2008 publiziert). Es resultierte jeweils ein Konstrukt mit Substitution des Elements 2 mit der DNA-Sequenz des Elements 1 (pD1+1(pApD)) oder mit einer *nonsense* Sequenz (pD1+Δ2(pApD), Abb. 19). Desweiteren wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem die 7 nt des distalen Elements, welche sich mit dem distalen Element der E-UAS_A überlagern, mit einer *nonsense* Sequenz substituiert wurden (pDΔ1+2(pApD), Abb. 19). Die hergestellten Konstrukte wurden bezüglich ihrer DNA-Sequenz auf die gewünschte Mutation hin überprüft und anschließend in den halobakteriellen Vektor pWL102 inseriert. Die jeweiligen Konstrukte (pApD WT, pD1+1(pApD), pD1+Δ2(pApD) und pDΔ1+2(pApD)) wurden zur Transformation von *Hfx. volcanii* WFD11 verwendet.

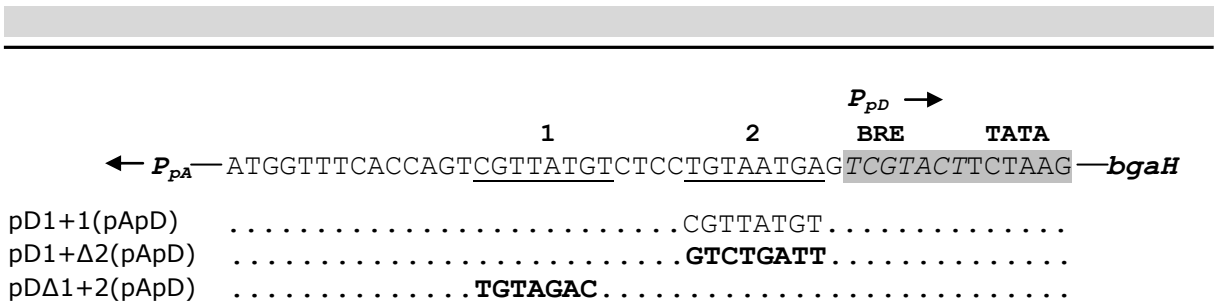


Abb. 19: Sequenzen der P_{pD} -Promotorregion und der drei P_{pD} -E-UAS-Mutanten im dualen $bgaH$ - P_{pD} - P_{pA} -p-*gvpA*-Promotorkonstrukt. TATA-Box und BRE (kursiv) des P_{pD} -Promotors sind grau hinterlegt. Die putativen GvpE-Interaktionsbereiche von P_{pD} sind unterstrichen. Das distale Element ist mit 1 gekennzeichnet, das proximale mit 2. Die Orientierung der beiden gegenläufigen Promotoren P_{pA} und P_{pD} ist schematisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Punkte markieren die Nukleotide, die mit der oben angegebenen P_{pD} -Sequenz identisch sind. Die *nonsense*-Sequenzen sind fett dargestellt.

Die Untersuchung der basalen Promotoraktivität erfolgte mit *Hfx. volcanii* E-UAS_{Mut}-*bgaH*+pJAS Doppeltransformaten, die Untersuchung der GvpE-induzierten Promotoraktivität mit E-UAS_{Mut}-*bgaH*+pE^{ex}-Doppeltransformaten. Die Plasmide aller Transformaten wurden isoliert und über Restriktions- bzw. Southern-Analysen auf ihre Richtigkeit überprüft. Der Nachweis des pGvpE-Proteins in den verschiedenen P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex}-Transformaten erfolgte mittels Western-Blot mit einem cGvpE-spezifischen Antiserum (Daten nicht gezeigt). Um die Reproduzierbarkeit der ermittelten spezifischen BgaH-Aktivität zu gewährleisten, wurden jeweils zwei bis drei Transformaten mit dem gleichen Konstrukt zweimal im ONPG-Test untersucht. Die errechneten spezifischen BgaH-Aktivitäten aller Messreihen wurden gemittelt und als Maß für die Streuung die entsprechenden Standardabweichungen bestimmt. Für die Reproduzierbarkeit der ermittelten p-*gvpA*-Transkriptmengen wurde aus jeweils zwei Transformaten die Gesamt-RNA isoliert und mittels RNA-Dot-Blot semiquantifiziert. Da die Promotoraktivität beider Promotoren P_{pD} und P_{pA} zum selben Zeitpunkt untersucht werden sollte, erfolgte die Entnahme der Zellen für den ONPG-Test und für die RNA-Isolierung aus derselben Kultur.

Analyse der basalen und pGvpE-induzierten P_{pD} -Aktivität in E-UAS_p-Varianten im pApD-Konstrukt

Das Wachstum der jeweiligen pApD WT+pJAS und P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pJAS bzw. pApD WT+pE^{ex} und P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex} Doppel-Transformaten wurde durch Messung der OD_{600nm} über 72 h verfolgt. Alle Transformaten zeigten einen vergleichbaren Wachstumsverlauf (Daten nicht gezeigt).

Zur Ermittlung der Basalaktivität von P_{pD} in diesem dualen Promotorkonstrukt wurde nach 54 h Wachstum in der frühstationären Wachstumsphase die spezifische BgaH-

Aktivität des pApD WT+pJAS und der P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pJAS-Transformanten ermittelt. Für den Wildtyp pApD WT+pJAS wurde eine spezifische Aktivität von 12 ± 2 mU/mg bestimmt (Abb. 20 A). Die spezifische Aktivität der E-UAS_D-Mutante pD1+1(pApD)+pJAS lag in der gleichen Größenordnung wie die des Wildtyps (Abb. 20 A). Für pD1+Δ2(pApD)+pJAS wurde eine leicht erhöhte, für pDΔ1+2(pApD)+pJAS eine leicht reduzierte spezifische BgaH-Aktivität ermittelt (Abb. 20 A). Die Untersuchungen zeigten, dass die in die E-UAS_D eingeführten Substitutionen die basale Aktivität des Promotors P_{pD} nicht beeinflussten.

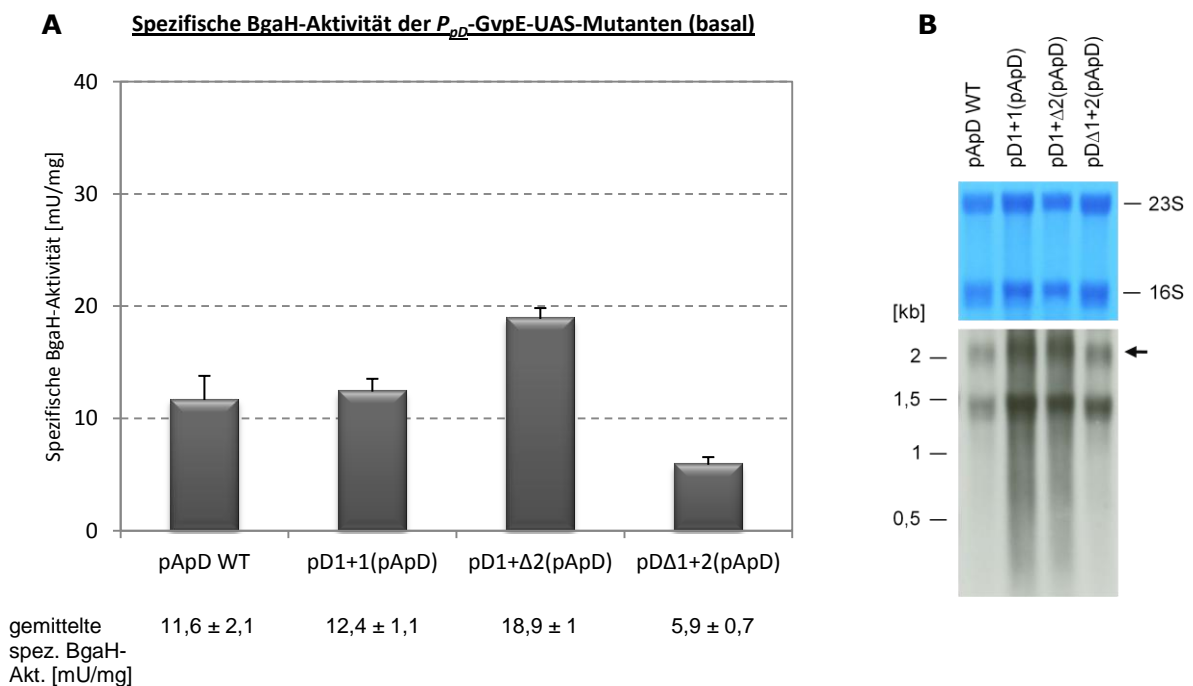


Abb. 20: A) Spezifische BgaH-Aktivitäten sowie **B)** *bgaH*-Transkriptmengen der entsprechenden P_{pD} -E-UAS+pJAS-Transformanten.

A) Die spezifischen BgaH-Aktivitäten wurden nach 54 h Wachstum als Maß für die P_{pD} -Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt.

B) Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA. Die dazugehörige Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methylenblau ist darüber gezeigt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Angabe der RNA-Größenstandards in kb auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

Die aus der früh-stationären Wachstumsphase isolierte Gesamt-RNA wurde zur Bestimmung der *bgaH*-Transkriptmengen in den Transformanten mittels Northern-Analyse verwendet. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte die Qualität und Quantität der einzelnen RNA-Präparationen (Abb. 20 B). Von pApD WT+pJAS wurde eine zu pD1+Δ2(pApD)+pJAS vergleichbare Menge an Gesamt-RNA aufgetragen; von den Transformanten pD1+1(pApD)+pJAS und pDΔ1+2(pApD)+pJAS im Vergleich etwas mehr. Mit einer gegen die *bgaH*-mRNA gerichteten Sonde wurden die 2,2 kb langen Transkripte und deren Abbauprodukte detektiert. Es konnte bei der E-UAS_D-Mutante

pD Δ 1+2(pApD)+pJAS im Vergleich zum pD WT+pJAS eine ähnliche *bgaH*-Transkriptmenge detektiert werden (Abb. 20 B). Bei den E-UAS_D-Mutanten pD1+1(pApD)+pJAS und pD1+ Δ 2(pApD)+pJAS war eine Erhöhung der Transkriptmengen zu beobachten (Abb. 20 B). Bereits der ONPG-Test zeigte, dass die Transformante pD1+ Δ 2(pApD)+pJAS eine im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöhte BgaH-Aktivität besaß. Bezieht man die Schwankungen der aufgetragenen RNA-Mengen mit ein, spiegelte das *bgaH*-Transkriptionsmuster die Ergebnisse des ONPG-Tests wider.

Um den Einfluss der in die E-UAS_D eingeführten Modifikationen auf die pGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} zu untersuchen, wurde von den P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex}-Transformanten nach 54 h Wachstum die spezifische BgaH-Aktivitäten mittels ONPG bestimmt. Bei der Analyse zeigten alle drei E-UAS_D-Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte P_{pD} -Aktivität (Abb. 21 A). Die durchschnittliche BgaH-Aktivität der pD1+1(pApD)+pE^{ex}-Transformante war um das knapp 6fache, die der pD1+ Δ 2(pApD)+pE^{ex}- um das 4fache und die der pD Δ 1+2(pApD)+pE^{ex}-Transformante um das 9fache reduziert. Das ließ vermuten, dass die Verwendung der gleichen Sequenz des distalen Elements 1 an beiden Positionen 1+2 und die Substitution des distalen oder proximalen Elements mit einer *nonsense* Sequenz die GvpE-vermittelte Aktivierung des P_{pD} -Promotors einschränkte.

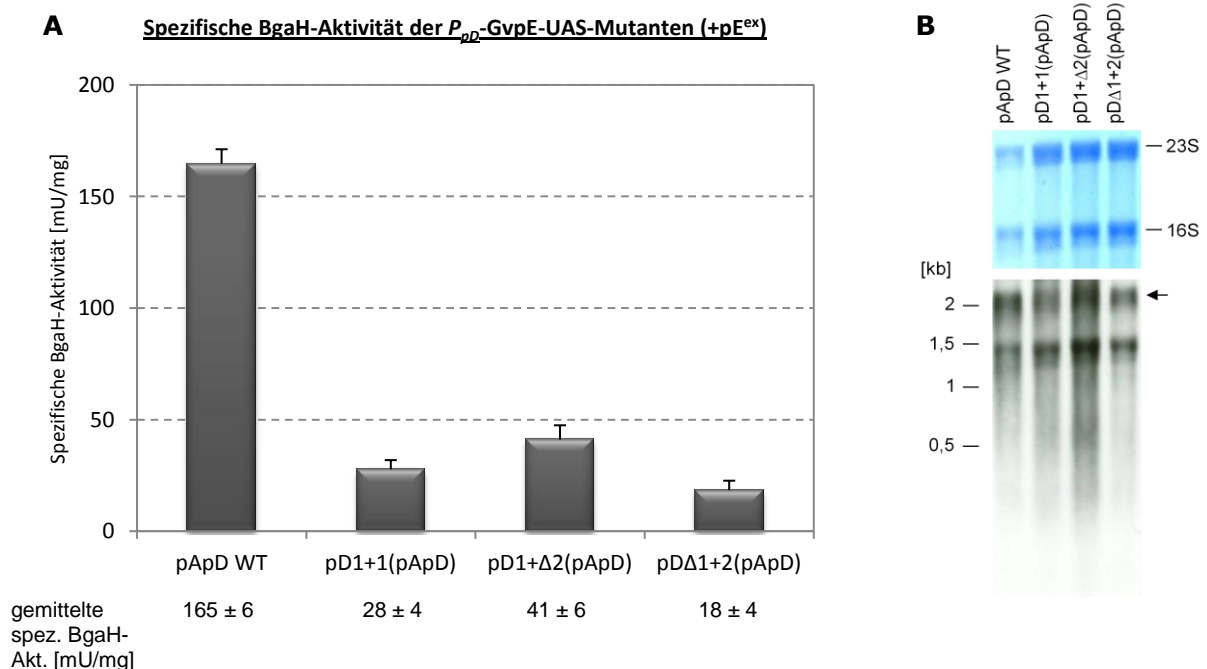


Abb. 21: A) Spezifische BgaH-Aktivitäten sowie **B)** *bgaH*-Transkriptmengen der entsprechenden P_{pD} -E-UAS+pE^{ex}-Transformanten.

A) Die spezifischen BgaH-Aktivitäten wurden nach 54 h Wachstum als Maß für die P_{pD} -Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt.

B) Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA. Die dazugehörige Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methylblau ist darüber gezeigt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Angabe der RNA-Größenstandards in kb auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

Zur Bestimmung der *bgaH*-Transkriptmenge in den verschiedenen Transformanten wurden zeitgleich zur Probenentnahme für den ONPG-Test, Proben für die Isolierung der Gesamt-RNA entnommen. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zeigte Menge und Qualität der aufgetragenen Gesamt-RNA (Abb. 21 B). Die *bgaH*-Transkripte und deren Abbauprodukte wurden mit einer strangspezifischen Sonde detektiert. Das Transkriptionsmuster der drei E-UAS_D-Mutanten entsprach den Ergebnissen des ONPG-Tests.

Die meisten *bgaH*-Transkripte wurde von der Transformante pD1+Δ2(pApD)+pE^{ex} gebildet (spezifische BgaH-Aktivität: 41 ± 6 mU/mg, Abb. 21 B). Im Vergleich dazu wurde von den Transformanten pD1+1(pApD)+pE^{ex} und pDΔ1+2(pApD)+pE^{ex} (Spezifische BgaH-Aktivitäten: 28 ± 4 mU/mg und 18 ± 4 mU/mg) geringere Mengen an *bgaH*-mRNA detektiert (Abb. 21 B). Vergleichsweise dazu schien die Transkriptmenge des pApD WT+pE^{ex} die Ergebnisse des ONPG-Tests nicht widerzuspiegeln, da im Vergleich zu pD1+Δ2(pApD)+pE^{ex} ein schwächeres Signal der *bgaH*-mRNA detektiert wurde. Mit Blick auf die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran wurde aber klar, dass von pApD WT+pE^{ex} deutlich weniger Gesamt-RNA aufgetragen wurde. Bezieht man dies mit ein, wurden von allen Transformanten den *bgaH*-Transkriptmengen gemäße BgaH-Mengen gebildet. Der reduzierten BgaH-Aktivität der Mutanten lag demnach eine im Vergleich zum Wildtyp schwächere *P_{pD}*-Promotoraktivität zugrunde.

Analyse der basalen und pGvpE-induzierten *P_{pA}*-Aktivität in E-UAS_D-Varianten im pApD-Konstrukt

Um zu überprüfen ob die in die *P_{pD}*-GvpE-UAS eingeführten Modifikationen die Aktivität des Promotors *P_{pA}* beeinflussten, wurde die Aktivität dieses Promotors semiquantitativ über die Menge an gebildeten p-*gvpA*-Transkripten mittels RNA-Dot-Blot bestimmt. Für die Ermittlung der *P_{pA}*-Basalaktivität und der pGvpE-induzierten *P_{pA}*-Aktivität wurde von allen Transformanten jeweils 1 µg Gesamt-RNA seriell 1:1 verdünnt. Als Kontrolle wurde die Gesamt-RNA der *Hfx. volcanii*-Transformante pWL102+pJAS35 (pWL/pJAS) verwendet. Die Detektion der p-*gvpA*-mRNA erfolgte mit einer strangspezifischen p-*gvpA*-Sonde. Die Methylenblau-gefärbten Nylonmembranen zeigten, dass von allen Transformanten ähnliche Mengen an Gesamt-RNA aufgetragen wurden (Abb. 22 A – C). Mit der Gesamt-RNA der pWL/pJAS-Transformante hybridisierte die *gvpA*-Sonde erwartungsgemäß nicht.

Die p-*gvpA*-mRNA wurde in der Transformante pApD WT+pJAS und den *P_{pD}*-E-UAS_{Mut}+pJAS-Transformanten in vergleichbaren Mengen gebildet (Abb. 22 A). Die RNA-Dot-Blot-Analyse mit der Gesamt-RNA aus der jeweils zweiten Transformante des

gleichen Konstrukts erbrachte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die in die $E\text{-}UAS_D$ eingeführten Modifikationen beeinflussten die Basalaktivität des Promotors P_{pA} nicht.

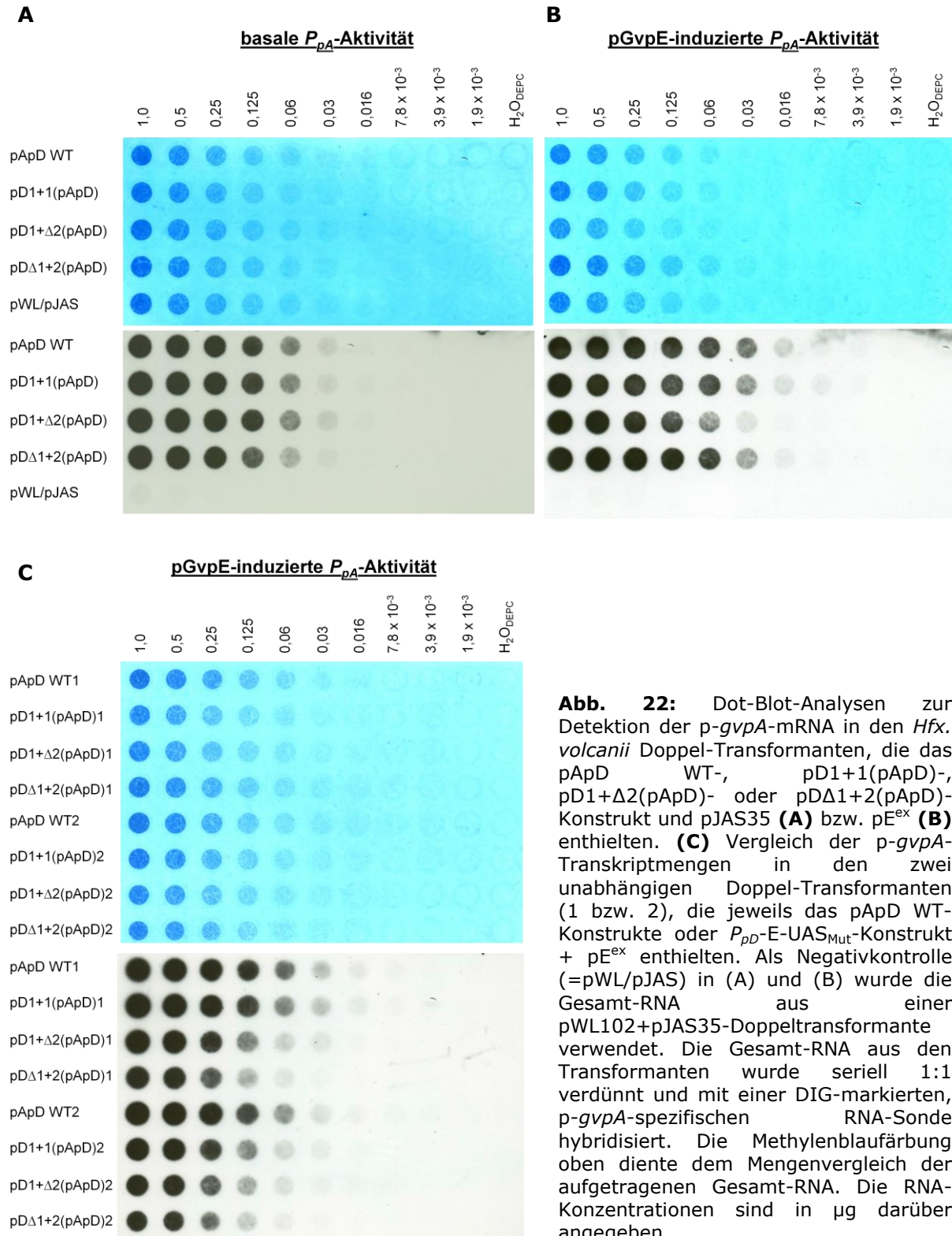


Abb. 22: Dot-Blot-Analysen zur Detektion der *p-gvpA*-mRNA in den *Hfx. volcanii* Doppel-Transformanten, die das pApD WT-, pD1+1(pApD)-, pD1+Δ2(pApD)- oder pDΔ1+2(pApD)-Konstrukt und pJAS35 (**A**) bzw. pE^{ex} (**B**) enthielten. (**C**) Vergleich der *p-gvpA*-Transkriptmengen in den zwei unabhängigen Doppel-Transformanten (1 bzw. 2), die jeweils das pApD WT-Konstrukte oder P_{pD} -E- UAS_{Mut} -Konstrukt + pE^{ex} enthielten. Als Negativkontrolle (=pWL/pJAS) in (A) und (B) wurde die Gesamt-RNA aus einer pWL102+pJAS35-Doppeltransformante verwendet. Die Gesamt-RNA aus den Transformanten wurde seriell 1:1 verdünnt und mit einer DIG-markierten, *p-gvpA*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Die Methyleneblaufärbung oben diente dem Mengenvergleich der aufgetragenen Gesamt-RNA. Die RNA-Konzentrationen sind in μg darüber angegeben.

Der zur Ermittlung der pGvpE-induzierten P_{pA} -Aktivität durchgeführte RNA-Dot-Blot zeigte, dass von der pApD WT+pE^{ex}- und pD1+1(pApD)+pE^{ex}-Transformante vergleichbare Mengen an p-gvpA-mRNA gebildet wurden (Abb. 22 B). Von der Transformante pD1+Δ2(pApD)+pE^{ex} schien im Vergleich zum pApD WT+pE^{ex} eine etwa 2fach geringere Menge an p-gvpA-Transkripten vorhanden zu sein (Abb. 22 B). Da von dieser Transformante aber im Vergleich etwas weniger Gesamt-RNA aufgetragen wurde, ist anzunehmen, dass in der pApD WT+pE^{ex}-, pD1+1(pApD)+pE^{ex}- und pD1+Δ2(pApD)+pE^{ex}-Transformante die p-gvpA-mRNA in vergleichbarer Menge vorhanden war. Von der Transformante pDΔ1+2(pApD)+pE^{ex} wurde im Vergleich geringfügig mehr Gesamt-RNA aufgetragen, das detektierte Signal der p-gvpA-mRNA ist im Gegensatz dazu aber etwa 2-4fach schwächer als das der pApD WT+pE^{ex}-Transformante (Abb. 22 B). Der Vergleich der pGvpE-induzierten gebildeten p-gvpA-Transkriptmengen in den beiden unabhängigen Transformanten pro Konstrukt ist in Abb. 22 C gezeigt. Generell zeigte sich, dass das Transkriptionsmuster zwischen P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex} 1 und P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex} 2 ähnlich war. In pApD WT+pE^{ex} 1 und pD1+1(pApD)+pE^{ex} 1 waren die p-gvpA-Transkripte in vergleichbarer Menge vorhanden. Von der Transformante pD1+Δ2(pApD)+pE^{ex} 1 wurde im Vergleich erneut geringfügig weniger Gesamt-RNA aufgetragen. Wird diese Schwankung mit einbezogen, besteht wahrscheinlich kein Unterschied der pGvpE-stimulierten Transkription an P_{pA} zwischen pD1+Δ2(pApD)+pE^{ex} 1 und pApD WT+pE^{ex} 1. Das detektierte Signal der p-gvpA-mRNA in der pDΔ1+2(pApD)+pE^{ex}-Transformante 1 ist wie in Abb. 22 B erneut im Vergleich zum pApD WT+pE^{ex} 1 etwa 4fach reduziert. Von pApD WT+pE^{ex} 2 wurde im Vergleich zu pD1+1(pApD)+pE^{ex} 2 und pD1+Δ2(pApD)+pE^{ex} 2 etwas mehr Gesamt-RNA aufgetragen. Die schwächeren Signale der p-gvpA-mRNA in diesen Transformanten waren wahrscheinlich auf diese Schwankungen zurückzuführen. Von der Transformante pDΔ1+2(pApD)+pE^{ex} 2 wurde zu pD1+Δ2(pApD)+pE^{ex} 2 eine vergleichbare und zu pApD WT+pE^{ex} 2 eine geringer Menge an Gesamt-RNA aufgetragen. Im Gegensatz dazu war das detektierte Signal der p-gvpA-mRNA in dieser Transformante etwa 2fach schwächer als das der pD1+Δ2(pApD)+pE^{ex} 2- und 4fach schwächer als das der pApD WT+pE^{ex} 2-Transformante. Daher ist anzunehmen, dass die GvpE-vermittelte P_{pA} -Aktivierung in dieser Transformante beeinträchtigt ist. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Untersuchungen überein, die eine Beeinflussung der GvpE-vermittelten Aktivierung beider Promotoren P_{pD} und P_{pA} durch Mutationen im Zentrum der intergenen Region zeigten (Marschaus 2007, Bauer *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse der Substitutionsmutagenesen der E-UAS_D im P_{pD} -Promotorkonstrukt und im *bgaH*- P_{pD} - P_{pA} -p-gvpA-Konstrukt sind in Tabelle 3 zusammen gefasst:

Tabelle 3: Spezifische BgaH-Aktivitäten mit Standardabweichungen in [mU/mg] in den *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten pApD WT+pJAS bzw. pD WT+pJAS und P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pJAS (basal) und pApD WT+pE^{ex} bzw. pD WT+pE^{ex} und P_{pD} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex} (aktiviert).

Transformante	P_{pD}-Aktivität im P_{pD}-Promotorkonstrukt		P_{pD}-Aktivität im dualen Promotorkonstrukt pApD	
	basal	+pE ^{ex}	basal	+pE ^{ex}
WT	3 ± 1,8	68 ± 21	11,6 ± 2,1	165 ± 6
pD1+1	3,6 ± 2	6 ± 1,5	12,4 ± 1,1	28 ± 4
pD1+Δ2	12,7 ± 4	11 ± 2,5	18,9 ± 1	41 ± 6
pDΔ1+2	4,7 ± 1,8	6 ± 2	5,9 ± 0,7	18 ± 4

Die Ersetzung des proximalen E-UAS_D-Elements 2 mit der Sequenz des distalen Elements 1 sowie die Substitution des distalen Elements 1 mit einer *nonsense* Sequenz führten sowohl im Einzel- als auch im dualen Promotorkonstrukt zu einem fast vollständigen Verlust der GvpE-Aktivierbarkeit des P_{pD} -Promotors. Die Substitution des proximalen Elements 2 mit einer *nonsense* Sequenz resultierte ebenfalls in einer stark reduzierten GvpE-induzierten P_{pD} -Aktivität. Nur die im Einzelpromotorkonstrukt hergestellte Mutante pD2+2 (Substitution des distalen Elements 1 mit der Sequenz des proximalen Elements 2) konnte eine zum Wildtyp vergleichbare Promotoraktivierung aufweisen. Interessanterweise hat diese Verdopplung des proximalen Elements 2 der P_{pA} -GvpE-UAS im Einzelpromotorkonstrukt ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung des P_{pA} -Promotors (Marschaus, 2007; Bauer *et al.*, 2008). Generell zeigte sich, dass mit Ausnahme der Mutante pD2+2 die in die E-UAS_D eingeführten Modifikationen - sowohl im Einzel- als auch im dualen Promotorkonstrukt - den gleichen Effekt auf die GvpE-vermittelte P_{pD} -Aktivierung besaßen: die Reduktion der GvpE-induzierten Transkription. Der Vergleich der gewonnenen Ergebnisse der Substitutions-Mutagenesen des P_{pA} -Promotors zeigt eine unterschiedliche Bedeutung für das distale E-UAS_A-Element für die P_{pA} -Aktivierung in Abhängigkeit des Vorhandenseins von P_{pD} . Im Gegensatz dazu scheint die Funktionalität der beiden E-UAS_D-Elemente für die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} unabhängig von P_{pA} zu sein.

4.1.2 *scanning* Mutagenese des P_{pD} -Promotors

Um neben putativer GvpE-Bindestelle, BRE und TATA-Box von P_{pD} weitere Bereiche identifizieren zu können, die für die basale und GvpE-induzierte Aktivität dieses Promotors von Bedeutung sind, wurde eine 4 bp *scanning* Mutagenese von -1 bis -50 (relativ zum Transkriptionsstart) durchgeführt. Hierfür wurden DNA-Sequenzen der P_{pD} -

Promotorregion in einem 50 bp langen Bereich stromauf des Transkriptionsstarts der *p-gvpD* mRNA gezielt im P_{pD} -Promotorkonstrukt substituiert. Die eingeführten Substitutionen wurden so gewählt, dass die inkorporierten Nukleotide nicht mit den Sequenzen der *c-vac*- und der *mc-vac* (aus *Hfx. mediterranei*, Englert *et al.*, 1992a) an der entsprechenden Position übereinstimmen. Die Promotoraktivitäten der unterschiedlichen P_{pD} -Mutanten wurden anschließend mit dem *bgaH*-Leserahmen als Reportergen im ONPG-Test untersucht.

4.1.2.1 Herstellung der P_{pD} -Mutanten

Die verschiedenen P_{pD} -Promotormutanten wurden durch ortsspezifische Mutagenese-PCR hergestellt, in dem gezielt DNA-Abschnitte in einem Raster von 4 nt (bzw. 3 nt in Mut12) stromauf des *p-gvpD*-Transkriptionsstarts substituiert wurden (Abb. 23). Als Matrize diente das vorhandene *pD* WT-Konstrukt in pBSKII+ (Bauer 2006, Bauer *et al.*, 2008). Die erhaltenen Plasmide wurden jeweils durch DNA-Sequenzanalysen auf ihre Richtigkeit überprüft. Anschließend wurde die Sequenz als P_{pD} -*bgaH*-Fusion in den halobakteriellen Vektor pWL102 inseriert.

		+1 └─▶
P_{pD}	CTCCTGTAATGAG <u>TCGTACTTCTAAG</u> TACGGAGAGTGTAAGCTTCTTAGACAGTC	
M1	ACAG.....	
M2	...GATC.....	
M3CTTA.....	
M4ATCA.....	
M5GGTA.....	
M6AACA.....	
M7ATAC.....	
M8CTGC.....	
M9CTCA.....	
M10AGGC.....	
M11CTGG.....	
M12GTA.....	

Abb. 23: *scanning* Mutagenese der P_{pD} -Promotorregion. Die Promotorelemente BRE (unterstrichen) und TATA-Box (in fett dargestellt) sind grau hinterlegt. Pfeil und +1 markiert den Transkriptionsstart. Die mutierten Promotorsequenzen sind unter der P_{pD} -Wildtyp-Sequenz angegeben. Punkte markieren die Nukleotide, die mit der oben angegebenen P_{pD} -Promotorregion identisch sind.

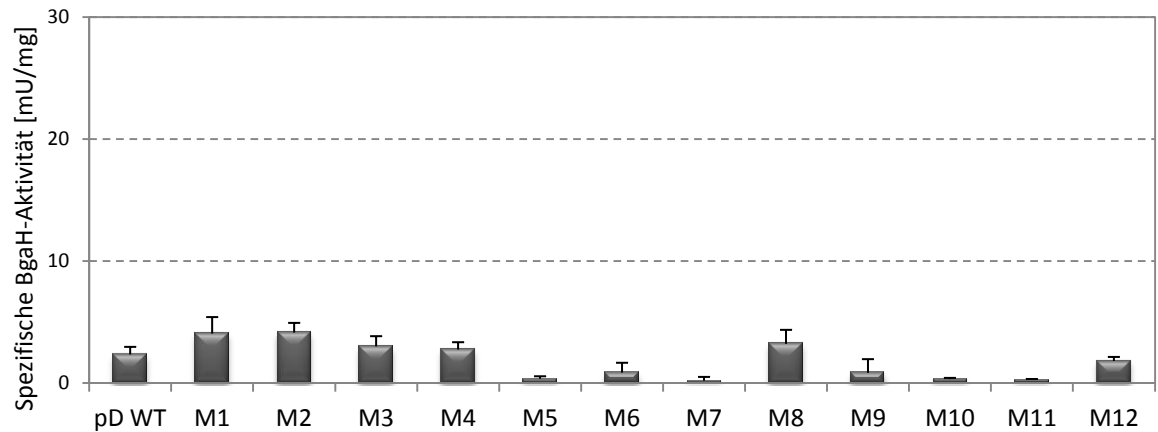
Zur Untersuchung der basalen Promotoraktivität erfolgte die Doppeltransformation von *Hfx. volcanii* mit dem entsprechenden Promotorkonstrukt in pWL102 und dem „leeren“ pJAS35-Vektor. Die Aktivierbarkeit der mutierten P_{pD} -Promotoren durch pGvpE wurde durch die Transformation von *Hfx. volcanii* WFD11 mit dem entsprechenden Promotor-

Konstrukt in pWL102 und pE^{ex} analysiert. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert und über eine Restriktions- bzw. Southern-Analyse kontrolliert. Die Produktion von pGvpE in den verschiedenen pD_{Mut}+pE^{ex}-Transformanten wurde mittels Western-Blot mit einem cGvpE-spezifischen Antiserum überprüft (Daten nicht gezeigt). Es wurden jeweils von zwei unabhängige Transformanten mit dem gleichen Konstrukt zwei- bis dreimal die spezifischen BgaH-Aktivitäten mittels ONPG-Test bestimmen. Die errechneten spezifischen BgaH-Aktivitäten aller Messreihen wurden gemittelt und als Maß für die Streuung die Standardabweichung bestimmt.

4.1.2.2 Analyse der basalen P_{pD} -Aktivität in den *scanning* Mutanten

Zunächst wurden die pD-Mut-*bgaH*+pJAS-Transformanten zur Ermittlung der basalen P_{pD} -Aktivität untersucht. Hierfür wurde von den Transformanten eine Wachstumskurve aufgenommen und nach 54 h Wachstum Proben für die Ermittlung der spezifischen BgaH-Aktivität sowie die Isolierung der Gesamt-RNA entnommen. In den Transformanten M1+pJAS bis M4+pJAS, M8+pJAS und M12+pJAS wurde eine ähnliche spezifische BgaH-Aktivität ermittelt wie in der pD WT+pJAS-Transformante (Abb. 24 A, Tabelle 4). Die Transformanten M5+pJAS bis M7+pJAS und M9+pJAS bis M11+pJAS zeigten eine reduzierte spezifische BgaH-Aktivität (Abb. 24 A, Tabelle 4). Die von diesen Mutationen betroffenen DNA-Regionen sind alle zwischen der TATA-Box und dem Transkriptionsstart im P_{pD} -Promotor lokalisiert. Auffällig war, dass die in M5, M6 und M7 mutierte Region in einem Bereich lokalisiert ist, der in hyperthermophilen Archaea durch den TBP-TFB-Komplex während der Transkriptionsinitiation bedeckt ist (Hausner *et al.*, 1996; Kosa *et al.*, 1997; Littlefield *et al.*, 1999).

Um die Veränderung der P_{pD} -Aktivität in den verschiedenen Mutanten auch auf Transkriptionsebene zu verifizieren, wurde mit der Gesamt-RNA der Transformanten eine Northern-Analyse durchgeführt. Anhand der Methylenblau-Färbung waren Schwankungen in der Konzentration der einzelnen Gesamt-RNAs zu sehen (Abb. 24 B). Im Vergleich zum Wildtyp wurde von M3+pJAS viel weniger und von M5+pJAS etwas weniger, von M6+pJAS und M8+pJAS dagegen deutlich mehr Gesamt-RNA aufgetragen. Bezieht man dies mit ein, ließ sich auch auf dieser Ebene die reduzierte Promotoraktivität in den Mutanten M5+pJAS bis M7+pJAS und M9+pJAS bis M11+pJAS nachweisen.

A**Spezifische BgaH-Aktivität der pD-Mut-*bgaH*-Transformanten (basal)**

Gemittelte Spez. BgaH-Akt. [mU/mg]

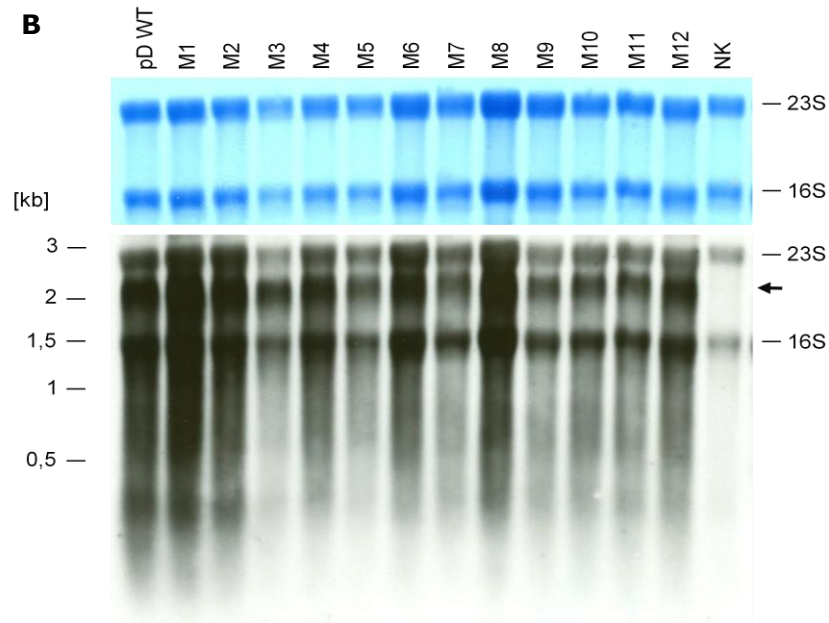
B

Abb. 24: A) Spezifische BgaH-Aktivitäten sowie **B)** *bgaH*-Transkriptmengen des pD WT und der P_{pD} -Promotormutanten

A) Die spezifischen BgaH-Aktivitäten wurden nach 54 h Wachstum als Maß für die P_{pD} -Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt.

B) Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA. Die dazugehörige Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methyleneblau ist darüber gezeigt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Angabe der RNA-Größenstandards in kb auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

4.1.2.3 Analyse der pGvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivierung

Um den Einfluss der in die P_{pD} -Promotorregion eingeführten Modifikationen auf die Aktivierbarkeit des Promotors durch GvpE zu untersuchen, wurden von den pD-Mut-*bgaH*+pE^{ex}-Transformanten eine Wachstumskurve aufgenommen, die BgaH-Aktivität ermittelt und die Gesamt-RNA mittels Northern-Blot analysiert. Die ermittelten spezifischen BgaH-Aktivitäten sind in Abb. 25 A in Form eines Säulendiagramms gezeigt. Die pD WT+pE^{ex}-Transformante wies eine spezifische BgaH-Aktivität mit dem statistischen Mittelwert von 104 ± 18 mU/mg auf. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten fast alle P_{pD} -Promotormutanten+pE^{ex} eine verringerte spezifische BgaH-Aktivität. Eine Ausnahme stellte dabei die Transformante M8+pE^{ex} dar, deren gemittelte BgaH-Aktivität (163 ± 47 mU/mg) gegenüber dem Wildtyp+pE^{ex} 1,6fach erhöht war. In den Transformanten M1+pE^{ex} bis M4+pE^{ex} und M12+pE^{ex} wurden nur leicht reduzierte (Faktoren zwischen 0,6 und 0,8) spezifische BgaH-Aktivitäten ermittelt. Die gravierendste Reduzierung der GvpE-stimulierten Promotoraktivität zeigten die Transformanten M5+pE^{ex} bis M7+pE^{ex} sowie M9+pE^{ex} bis M11+pE^{ex}. In allen sechs Promotor-Mutanten war bereits die P_{pD} -Basalaktivität beeinträchtigt (Abb. 24, Tabelle 4). Interessanterweise konnte dabei aber in Gegenwart von GvpE die P_{pD} -Aktivität in den Mutanten M5+pE^{ex}, M6+pE^{ex}, M10+pE^{ex} und M11+pE^{ex} trotzdem um einen ähnlichen Faktor aktiviert werden wie in der pD WT+pE^{ex}-Transformante (Tabelle 4). Der P_{pD} -Promotor in M7+pE^{ex} konnte dagegen nicht durch GvpE stimuliert werden (Tabelle 4). Da die basale Promotoraktivität der Mutanten M1 bis M4 nicht beeinträchtigt war, der Faktor der GvpE-Induktion aber nicht dem des WT entsprach, ist anzunehmen, dass aufgrund dieser Mutationen die GvpE- P_{pD} -Wechselwirkung geschwächt wurde. Auch die Analyse der Gesamt-RNA mittels Northern-Blot mit einer strangspezifischen *bgaH*-Sonde bestätigte die Veränderung der *bgaH*-Transkriptmengen in den unterschiedlichen Mutanten (Abb. 25 B).

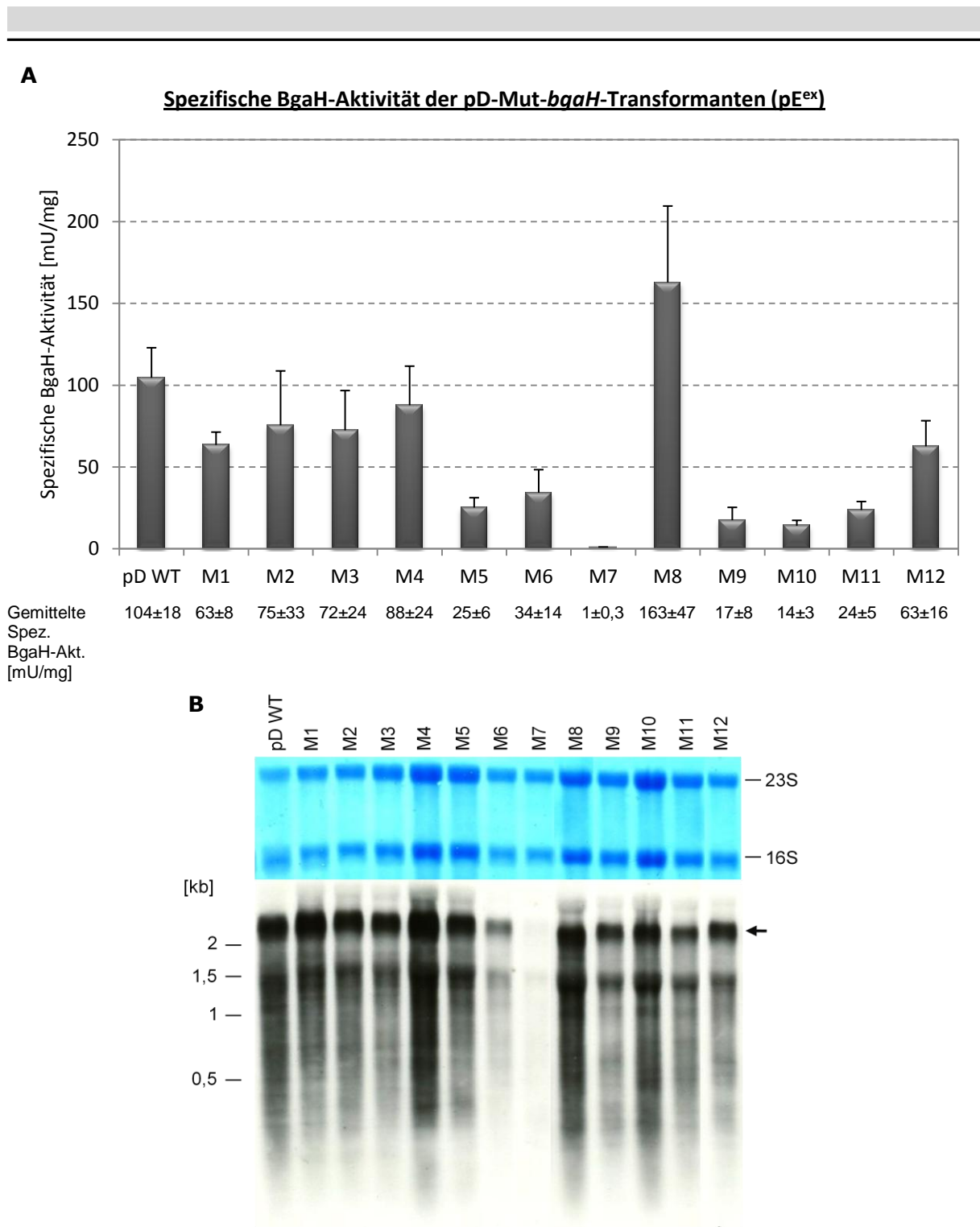


Abb. 25: A) Spezifische BgaH-Aktivitäten sowie **B)** *bgaH*-Transkriptmengen des pD WT und der *P_{pD}*-Promotormutanten

A) Die spezifischen BgaH-Aktivitäten wurden nach 54 h Wachstum als Maß der *P_{pD}*-Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt.

B) Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA. Die dazugehörige Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methylenblau ist darüber gezeigt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Angabe der RNA-Größenstandards in kb auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

Tabelle 4: Spezifische BgaH-Aktivitäten in den *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten pD WT+pJAS und pD_{Mut1-12}+pJAS (basal) bzw. pD WT+pE^{ex} und pD_{Mut1-12}+pE^{ex} (aktiviert) sowie der Faktor der durch GvpE-vermittelten *P_{pD}*-Aktivierung.

Transformante	Spez. BgaH-Akt. basal [mU/mg]	Spez. BgaH-Akt. aktiviert [mU/mg]	Faktor der Induktion
pD WT	2,4 ± 0,6	104 ± 18	43
M1	4 ± 1,4	63 ± 8	16
M2	4,2 ± 0,8	75 ± 33	19
M3	3 ± 0,8	72 ± 24	24
M4	2,8 ± 0,6	88 ± 24	31
M5	0,4 ± 0,2	25 ± 6	63
M6	0,9 ± 0,8	34 ± 14	38
M7	0,2 ± 0,3	1 ± 0	n.d.*
M8	3,2 ± 1,2	163 ± 47	51
M9	0,9 ± 1,1	17 ± 8	19
M10	0,3 ± 0,1	14 ± 3	47
M11	0,3 ± 0,1	24 ± 5	80
M12	1,8 ± 0,3	63 ± 16	35

* n.d. = nicht messbar

Werden die Ergebnisse zusammengefasst, zeigte sich ein starker Einfluss der Region stromab der TATA-Box des *P_{pD}*-Promotors auf die Promotoraktivität. Mutationen in diesem Bereich führten sowohl zu einer Reduktion der Basalaktivität, als auch zu einer - im Vergleich zum Wildtyp - verminderten GvpE-induzierten Aktivität.

4.1.3 Einfluss von GvpE-UAS, BRE und TATA-Box auf die Promotoraktivität von *P_{pD}* und *P_{pA}* – Analyse von Promotorchimären

Die bislang erhaltenen Daten zeigten, dass Teile der beiden E-UAS die GvpE-Aktivierung der Promotoren *P_{pD}* und *P_{pA}* unterschiedlich beeinflussten. In früheren Untersuchungen wurden die basalen Promotoraktivitäten von *P_{pD}* und *P_{pA}* mit dem *bgaH*-Leserahmen als Reporter bereits untersucht (Hofacker *et al.*, 2004; Sartorius-Neef, 2005). Der Vergleich der Aktivität beider Promotoren ergab, dass der *P_{pA}*-Promotor eine stärkere Basalaktivität als *P_{pD}* besitzt. Bei der Analyse der GvpE-induzierten Promotoraktivität von *P_{pD}* und *P_{pA}* zeigte *P_{pA}* eine starke Stimulierung durch GvpE als der *P_{pD}*-Promotor (Hofacker *et al.*, 2004). Mit Hilfe der BgaH als Reporter wurde für *P_{pA}* eine GvpE-stimulierte Aktivität von 541 ± 77 mU/mg und für *P_{pD}* eine GvpE-stimulierte Aktivität von 19 ± 3 mU/mg (+pE^{ex}) ermittelt. Die durch GvpE stimulierte Aktivität von *P_{pD}* ist demnach etwa 28fach geringer als die entsprechende Aktivität von *P_{pA}*.

Die von Hofacker *et al.* (2004) ermittelten Promotoraktivitäten von P_{pD} sind nicht mit den in dieser Arbeit ermittelten vergleichbar, da es sich um unterschiedliche Promotorkonstrukte handelt. Das bei Hofacker *et al.* (2004) verwendete P_{pD} -Konstrukt enthält die P_{pD} -Promotorregion bis zum Transkriptionsstart, den mRNA-*leader* und die ersten 15 nt von p-*gvpD* fusioniert an den *bgaH*-Leserahmen. Das in dieser Arbeit verwendete P_{pD} -Promotorkonstrukt ist „*leader-lost*“ und enthält die P_{pD} -Promotorregion bis zum Transkriptionsstart und die ersten 18 nt von p-*gvpA* fusioniert an den *bgaH*-Leserahmen (Bauer *et al.*, 2008). Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass *leader-lose* mRNAs besser translatiert werden als *leader*-haltige (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004; Sartorius-Neef, 2005). Daher wurde in dieser Arbeit für die Analyse der unterschiedlichen P_{pD} -Mutanten das „*leader-lost*“-Konstrukt verwendet, um auch bei schwacher Promotoraktivität die enzymatische Aktivität der BgaH messen zu können.

Weiterhin konnte ein Einfluss des BR-Elements, der TATA-Box und der Position um -10 (relativ zum Transkriptionsstart) des P_{pA} -Promotors auf dessen Aktivität gezeigt werden (Hofacker *et al.*, 2004). Modifikationen innerhalb dieser DNA-Abschnitte resultierten in einer nicht messbaren Basalaktivität und einer deutlich reduzierten GvpE-stimulierten P_{pA} -Promotoraktivität. Eine Ausnahme stellt dabei eine Mutante dar, in der das 5'-Ende des P_{pA} -BRE modifiziert wurde. Die Modifikation führt zu einer höheren Sequenz-Übereinstimmung mit der für hyperthermophilen Archaea ermittelten BRE-Konsensussequenz cRnaAnt (Qureshi & Jackson, 1998; Littlefield *et al.*, 1999) und resultiert in einer stark erhöhten Basalaktivität des P_{pA} -Promotors. Das lässt vermuten, dass die Sequenz des BRE die Promotorstärke von P_{pA} beeinflusst oder sogar bestimmt (Hofacker *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurden deshalb Promotorchimären erzeugt, indem die BR-Elemente der Promotoren P_{pA} und P_{pD} gegenseitig ausgetauscht wurden, um einen Einfluss dieser Elemente BRE_A und BRE_D auf die Stärke der Promotoraktivitäten zu untersuchen (Abb. 26). Um einen Hinweis auf weitere Faktoren zu bekommen, die die Promotorstärken determinieren, erfolgte daneben auch ein Austausch der beiden TATA-Boxen (TATA_A und TATA_D), der gemeinsame Austausch von BRE und TATA-Box sowie ein Austausch der beiden putativen GvpE-Bindestellen (Abb. 26). Letzteres erfolgte durch die Inversion der intergenen Region zwischen den Promotoren P_{pD} und P_{pA} . Die Inversion betraf entweder nur die intergene Region (invE), die intergene Region mit beiden BR-Elementen (invE+B) oder den DNA-Abschnitt der intergenen Region mit beiden BRE und TATA-Boxen (invE+B+T; Abb. 26). Da die Auswirkung der eingeführten Modifikationen auf die Aktivität der Promotoren P_{pD} und P_{pA} simultan untersucht werden sollte, wurde die Aktivität beider Promotoren parallel untersucht. Mögliche Auswirkungen der in den P_{pA} -Promotor eingeführten Mutationen wurden mit dem *bgaH*-Leserahmen als Reportergen im ONPG-Test untersucht. Die Aktivität des P_{pD} -Promotors sollten dagegen mittels

quantitativer Real-Time-PCR anhand des *p-gvpD*-Transkripts analysiert werden. Zum direkten Vergleich der Aktivitäten von P_{pD} und P_{pA} sollte die P_{pA} -Promotoraktivität ebenfalls mittels quantitativer Real-Time-PCR anhand des *bgaH*-Transkripts ermittelt werden.

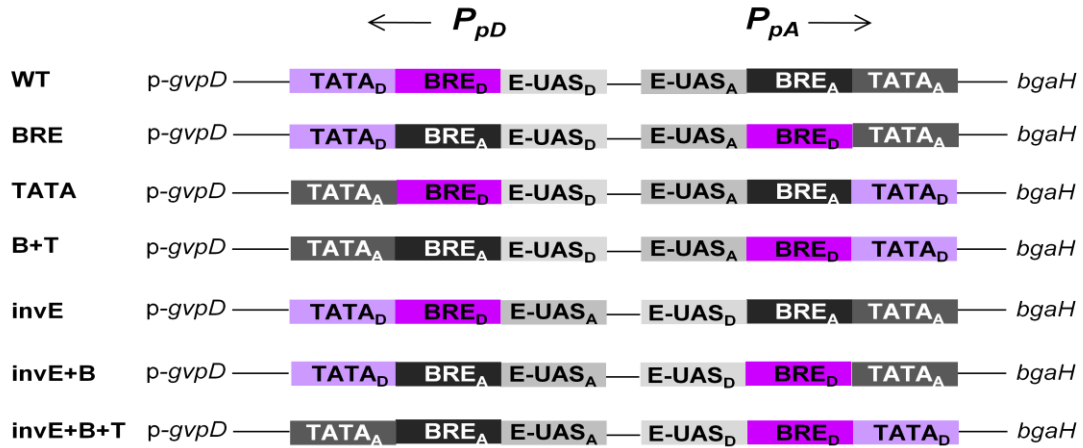


Abb. 26: Schematische Darstellung der P_{pD} - P_{pA} -Promotorchimären im dualen *p-gvpD-P_{pD}-P_{pA}-bgaH*-Promotorkonstrukt. Die Pfeile geben die Orientierung der Promotoren an.

Alle Promotormutanten wurden über ortsspezifische Mutagenese-PCR mit pD_{UGAP}A in pBIISK+ als Matrice hergestellt. Die Konstrukte wurden anschließend zur Überprüfung der eingeführten Mutationen sequenziert. Für die Transformation von *Haloferax volcanii* WFD11 wurden die Fragmente als *XbaI/AarI*-Fragment in den halobakteriellen shuttle-Vektor pWL102, der bereits den *bgaH*-Leserahmen enthielt, inseriert. Zur Untersuchung der basalen Promotoraktivität erfolgte die Doppeltransformation von *Hfx. volcanii* mit dem entsprechenden chimären Promotorkonstrukt in pWL102 und dem „leeren“ pJAS35. Die Aktivierbarkeit der verschiedenen Promotorchimären durch pGvpE wurde durch die Transformation von *Hfx. volcanii* mit dem entsprechenden chimären Promotorkonstrukt in pWL102 und pE^{ex} analysiert. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert und über Restriktions- bzw. Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Expression des pGvpE-Proteins in den verschiedenen pDpA_{Mut}+pE^{ex}-Transformanten wurde mittels Western-Blot mit einem cGvpE-spezifischen Antiserum kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

Um die Reproduzierbarkeit der ermittelten spezifischen BgaH-Aktivität zu gewährleisten, wurden jeweils zwei bis drei Transformanten mit dem gleichen Konstrukt zwei- bis viermal im ONPG-Test untersucht. Um die Reproduzierbarkeit der ermittelten *p-gvpD*-Transkriptmengen zu gewährleisten, wurde jeweils aus zwei Transformanten mit dem gleichen Konstrukt die Gesamt-RNA isoliert und die *p-gvpD*-Transkriptmengen mittels qRT-PCR quantifiziert. Da die Promotoraktivität beider Promotoren P_{pD} und P_{pA} zum

gleichen Zeitpunkt untersucht wurde, erfolgte die Entnahme der Zellen für den ONPG-Test und für die RNA-Isolierung zeitgleich aus derselben Kultur.

4.1.3.1 Analyse der basalen und pGvpE-vermittelten P_{pA} -Aktivität in den Promotorchimären

Die Quantifizierung der basalen und pGvpE-vermittelten P_{pA} -Aktivität der verschiedenen P_{pD} - P_{pA} -Promotorchimären erfolgte über Expression des *bgaH*-Leserahmens und anschließend enzymatischen Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität der BgaH. Im ONPG-Test konnten in den Zelllysaten der TATA+pJAS-, invE+pJAS- und invE+B+pJAS-Transformanten im Vergleich zum pApD WT+pJAS ähnliche spezifische BgaH-Aktivitäten ermittelt werden (Abb. 27 A). Dagegen resultierte der gegenseitige Austausch der BRE-Sequenzen in den Transformanten BRE+pJAS und B+T+pJAS in einem vollständigen Aktivitätsverlust des P_{pA} -Promotors (Abb. 27 A). Die Transformante invE+B+T+pJAS zeigte eine stark reduzierte spezifische BgaH-Aktivität (Abb. 27 A). Die in Abb. 27 B dargestellte Northern-Analyse bestätigte die Reduktion der *bgaH*-mRNA in den BRE+pJAS-, B+T+pJAS- und invE+B+T+pJAS-Transformanten. In der BRE+pJAS- und B+T+pJAS-Transformante konnte jeweils nur eine sehr geringe Menge der *bgaH*-mRNA detektiert werden. Das spricht dafür, dass der P_{pA} -Promotor in diesen Transformanten nicht vollständig inaktiv vorlag, sondern die Aktivität extrem reduziert war und unter der Nachweisgrenze des ONPG-Tests lag. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des ONPG-Tests und der Northern-Analyse, dass das BRE_A einen großen Anteil an der basalen P_{pA} -Promotorstärke hat.

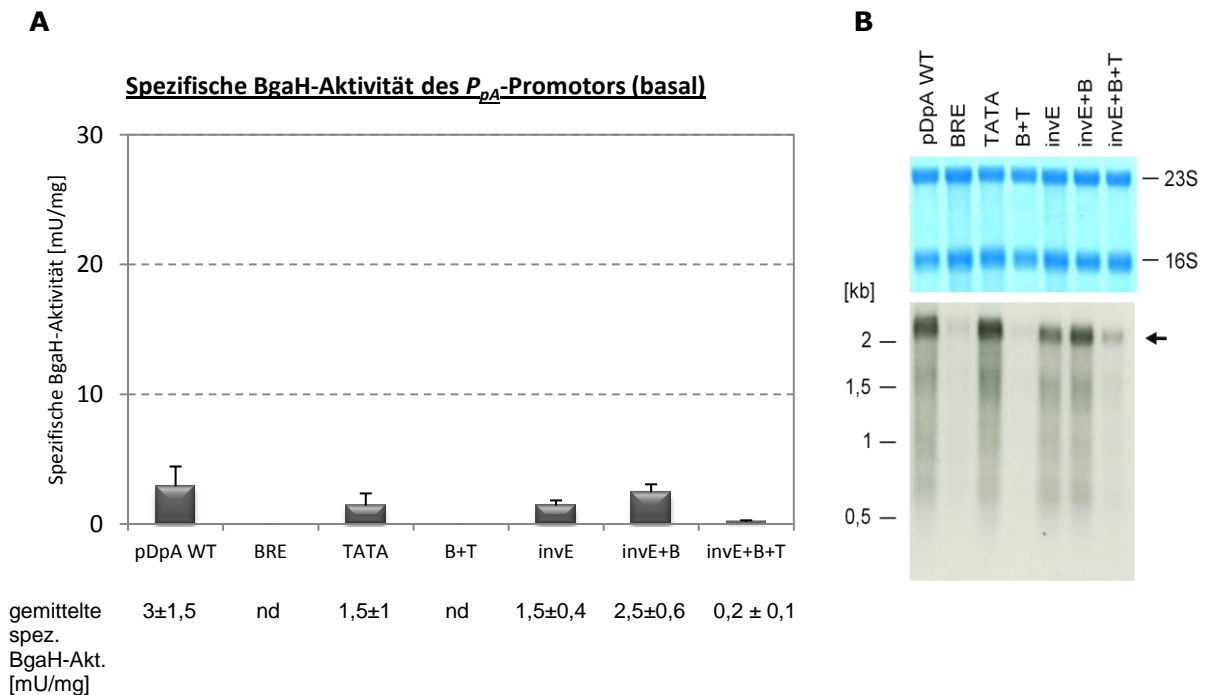


Abb. 27: A) Spezifische BgaH-Aktivitäten sowie **B)** *bgaH*-Transkriptmengen der *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten, die das entsprechende chimäre P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukt und den pJAS35-Vektor enthielten. A) Die spezifische BgaH-Aktivitäten wurden nach 54 h Wachstum als Maß für die P_{pA} -Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt. nd = keine messbare BgaH-Aktivität B) Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA Die dazugehörige Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methylenblau ist darüber gezeigt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Angabe der RNA-Größenstandards in kb auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

Im Falle der pGvpE-vermittelten Aktivierung der P_{pA} -Promotorchimären wurde nur ein geringer Anstieg der Promotoraktivität in den Transformanten BRE+pE^{ex}, B+T+pE^{ex}, invE+pE^{ex} und invE+B+T+pE^{ex} beobachtet (Abb. 28 A). Die geringsten BgaH-Aktivitäten wurden dabei in den Transformanten BRE+pE^{ex} und B+T+pE^{ex} vermerkt, bei denen der Austausch der BRE-Sequenzen, bzw. der BRE-Sequenzen und TATA-Boxen zwischen den Promotoren P_{pD} und P_{pA} erfolgte. Für beide Mutanten konnten bei der Untersuchung der Basalaktivität keine BgaH-Aktivitäten im ONPG-Test nachgewiesen werden. Durch Anwesenheit von pGvpE wurde der P_{pA} -Promotor der BRE-Promotorchimäre trotzdem aktiviert und erreichte eine Stimulation der BgaH-Aktivität auf 30 ± 7 mU/mg (Abb. 28 A, Tabelle 5). Die Aktivierung des P_{pA} -Promotors in der B+T-Promotorchimäre war dagegen bedeutend geringer, die spezifische BgaH-Aktivität erreichte nur eine Erhöhung auf $8 \pm 3,7$ mU/mg (Abb. 28 A, Tabelle 5). Von diesen Ergebnissen ließ sich erneut ein signifikanter Beitrag der BRE_A-Sequenz auf die P_{pA} -Promotorstärke ableiten. Der Austausch der beiden E-UAS zwischen P_{pD} und P_{pA} durch Inversion der intergenen Region (invE) hatte eine im Vergleich zum pDpA WT+pE^{ex} 1,8fach reduzierte Aktivierung des P_{pA} -

Promotors zur Folge. Die Inversion der gesamten Promotorregion in der Mutante invE+B+T führte sogar zu einer 2,6fachen Reduktion der GvpE-stimulierten P_{pA} -Aktivität. Die in die Mutante invE+B+T eingeführte Modifikation beeinträchtigte bereits die Basalaktivität des P_{pA} -Promotors, dennoch kann durch pGvpE die Aktivität um 100% gesteigert werden (Tabelle 5). Dagegen beeinflusste der Austausch der TATA-Boxen in der TATA-Mutante die GvpE-stimulierte P_{pA} -Aktivität nicht: Für diese P_{pD} - P_{pA} -Promotorchimäre wurde eine zum Wildtyp vergleichbare spezifische BgaH-Aktivitäten ermittelt.

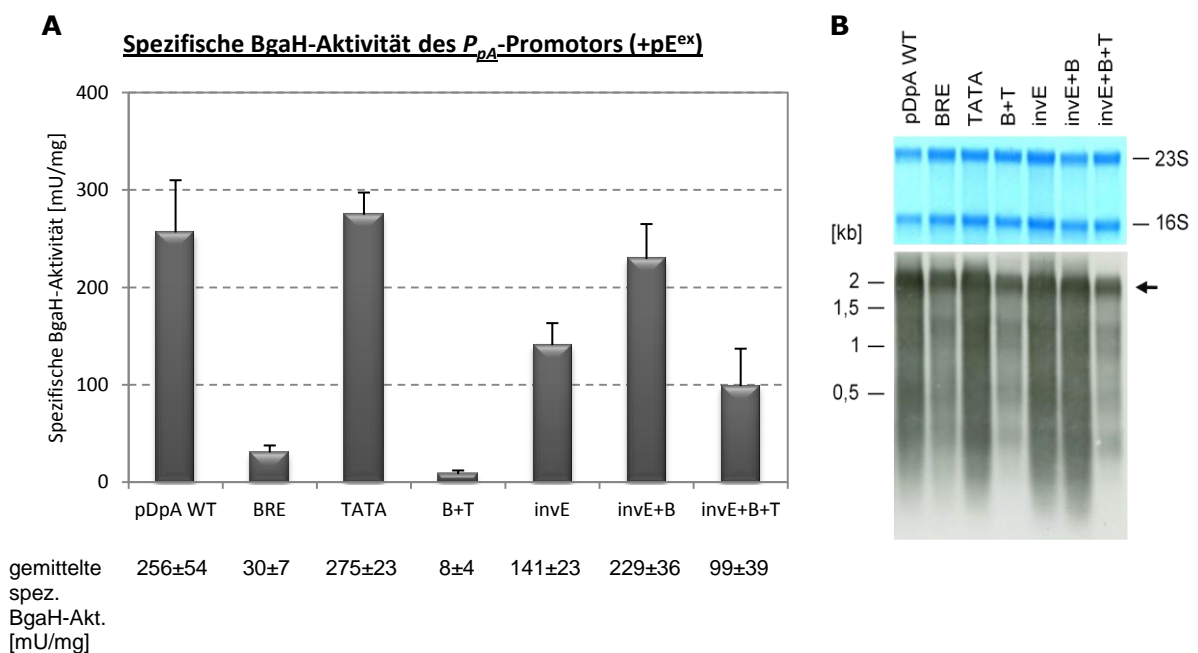


Abb. 28: **A)** Spezifische BgaH-Aktivitäten sowie **B)** *bgaH*-Transkriptmengen der *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten, die das entsprechende chimäre P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukt und pE^{ex} enthielten. A) Die spezifische BgaH-Aktivitäten wurden als Maß für die P_{pA} -Aktivität nach 54 h Wachstum mittels ONPG-Test bestimmt. B) Northern-Analyse zur Detektion der *bgaH*-mRNA. Die dazugehörige Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methylenblau ist darüber gezeigt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Angabe der RNA-Größenstandards in kb auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

Um die Veränderung der P_{pA} -Aktivität in den verschiedenen Mutanten zu bestätigen, wurde die Gesamt-RNA der Transformanten in einer Northern-Analyse untersucht. Die Detektion der *bgaH*-Transkripte in den unterschiedlichen Transformanten erfolgte mit einer strangspezifischen *bgaH*-Sonde. Die *bgaH*-mRNA und deren Abbauprodukte konnte in allen Transformanten detektiert werden (Abb. 28 B). Bezieht man die leichten Schwankungen in den Gesamt-RNA-Konzentrationen mit ein, entsprachen sich die im ONPG-Test und der Northern-Analyse ermittelten P_{pA} -Aktivitäten. Die Ergebnisse

deuteten darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen E-UAS-Sequenz und Stärke der GvpE-Induktion besteht, da der gegenseitige Austausch der E-UAS-Sequenzen durch Inversion der intergenen Region zu einer Reduktion der GvpE-stimulierten P_{pA} Aktivität führte. Da die Fusion der P_{pD} -Promotorregion mit der Region stromab von TATA_A in der invE+B+T-Mutante im Vergleich zum nativen P_{pA} -Promotor in pDpA WT zu niedrigeren BgaH-Aktivitäten führte, schien entweder die Region stromab von TATA_A ebenfalls bedeutsam für die GvpE-Aktivierung, oder die reduzierte BgaH-Aktivität war ein Resultat des vollständigen Transfers des schwächeren P_{pD} an Position von P_{pA} . Die Transformanten TATA+pE^{ex} (Austausch TATA-Boxen) sowie invE+B+pE^{ex} (Inversion der intergenen Region zusammen mit beiden BR-Elementen) zeigten spezifische BgaH-Aktivitäten in der für den P_{pA} -Wildtyp in der pDpA WT+pE^{ex} ermittelten Größenordnung.

Tabelle 5: Spezifische BgaH-Aktivitäten der *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten pDpA WT+pJAS und pDpA_{Mut}+pJAS (basal) sowie pDpA WT+pE^{ex} und pDpA_{Mut}+pE^{ex} (aktiviert) und der Faktor der durch GvpE-vermittelten P_{pA} -Aktivierung.

Transformante	Spez. BgaH-Akt. basal [mU/mg]	Spez. BgaH-Akt. aktiviert [mU/mg]	Faktor der Induktion
pDpA WT	3 ± 1,5	256 ± 54	85
BRE	n.d.*	30 ± 7	n.d.**
TATA	1,5 ± 1	275 ± 23	183
B+T	n.d.*	8 ± 4	n.d.**
invE	1,5 ± 0,4	141 ± 23	94
invE+B	2,5 ± 0,6	229 ± 36	91
invE+B+T	0,2 ± 0,1	99 ± 39	495

* n.d. = nicht messbar

** aufgrund der nicht messbaren Basalaktivität nicht ermittelbar

4.1.3.2 Analyse der basalen und pGvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivität in den Promotorchimären

Die Ermittlung der basalen und pGvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivität in den verschiedenen P_{pD} - P_{pA} -Promotorchimären sollte über die Expression des p-*gvpD*-Leserahmens und anschließender Quantifizierung der synthetisierten mRNA über quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR) erfolgen. Die Quantifizierung der p-*gvpD*-Transkripte erfolgte mittels SYBR-Green in dem StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Um den Expressionsunterschied des p-*gvpD*-Leserahmens in den verschiedenen Mutanten zu bestimmen, wurde die Methode zur relativen Quantifizierung ($\Delta\Delta C_T$ -Methode, Livak & Schmittgen, 2001) gewählt. Dabei wurde die Expression des p-*gvpD*-Leserahmens mit

der Expression des Referenzgens *rpoB'*, welches für eine der großen Untereinheiten der RNA-Polymerase kodiert und konstitutiv exprimiert sein sollte, normalisiert. Die relative Expression des *p-gvpD*-Leserahmens in den Promotorchimären wurde auf die Expression von *p-gvpD* in der Wildtyp-Transformante bezogen. Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sollten die Transkriptmengen aus jeweils zwei Transformanten mit dem gleichen Konstrukt untersucht und die jeweiligen C_T -Werte bestimmt werden. Bei der Auswertung stellte sich allerdings heraus, dass sich die Unterschiede in der P_{pD} -Promotoraktivität als nicht signifikant genug für die Differenzierung über die gewählte qRT-PCR-Methode waren. Wie anhand der in Tabelle 6 für die Transformanten BRE+pJAS, TATA+pJAS und B+T+pJAS sowie BRE+pE^{ex}, TATA+pE^{ex} und B+T+pE^{ex} exemplarisch aufgelisteten Daten zu sehen, sind die ermittelten $\Delta\Delta C_T$ -Werte sehr gering und zwischen Transformante 1 und 2 nicht konstant.

Tabelle 6: Relative Expressionsunterschiede des *p-gvpD*-Leserahmens in den BRE-, TATA- und B+T-Transformanten. Analysiert wurden die Transkriptmengen die unter Kontrolle des nicht aktivierten (basal) und des pGvpE-stimulierten (aktiviert) P_{pD} -Promotors produziert wurden. Die Expression des *p-gvpD*-Leserahmens wurde mit der Expression des Referenzgens *rpoB'* normalisiert und anschließend die relative *p-gvpD*-Expression in den Promotorchimären auf die relative Expression in der Wildtyp-Transformante bezogen. Es wurden jeweils zwei unabhängige biologische Replikate (Transformante 1 und 2) miteinander verglichen.

		$\Delta\Delta C_T$	
		Transformante 1	Transformante 2
basal	BRE	-1,78 ± 0,1	0,17 ± 0,3
	TATA	1,12 ± 1,45	-0,12 ± 0,1
	B+T	0,79 ± 0,66	1,65 ± 0,11
aktiviert	BRE	0,38 ± 0,11	2 ± 0,08
	TATA	0,65 ± 2,18	1,03 ± 0,41
	B+T	2,2 ± 0,13	3,14 ± 0,07

Ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 1 bedeutet eine in Bezug auf den Wildtyp verdoppelte Transkriptmenge. Die entspricht genau einem PCR-Zyklus. RNA-Abbau in den Proben oder etwa leichte Konzentrationsunterschiede der Ziel-mRNA in beiden Mutanten können zu Schwankungen der $\Delta\Delta C_T$ -Werte führen. Liegen die ermittelten $\Delta\Delta C_T$ -Werte innerhalb dieser Fehlergrenze und sind die Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Proben nur gering, lassen sich die Unterschiede kaum differenzieren und die Werte nur schwer oder gar nicht reproduzieren. Betrachtet man die Ergebnisse der ONPG-Tests in vorliegender Arbeit, so fällt auf, dass die Unterschiede in den Promotoraktivitäten der einzelnen Mutanten sehr variabel waren und teilweise nicht stark vom Wildtyp abwichen. Eine z.B. um den Faktor 0,5 reduzierte Promotoraktivität führte bereits zu signifikanten und

reproduzierbaren Änderungen der BgaH-Aktivität. Dieser Faktor würde bei der Analyse via qRT-PCR keinem ganzen Zyklus Unterschied entsprechen. Aufgrund der gewonnenen Erfahrung mit den bisher analysierten Promotormutanten, wurden für die pDpA-Promotorschimären keine extremen Unterschiede in der P_{pD} -Aktivität erwartet. Für schwache Expressionsunterschiede waren dementsprechend niedrige, im Fehlerbereich lokalisierte $\Delta\Delta C_T$ -Werte zu erwarten. Daher ist die $\Delta\Delta C_T$ -Methode für die Ermittlung der P_{pD} -Aktivität ungeeignet.

Die Expression des p-*gvpD*-Leserahmens in den verschiedenen Transformanten sollte deshalb über die absolute Quantifizierung anhand einer gegebenen Kalibrierkurve ermittelt werden. Mit dieser Methode lassen sich die absoluten Startkopienzahlen in den unterschiedlichen Ansätzen untereinander vergleichen. Dafür wurde für den p-*gvpD*-Leserahmen eine Eichreihe (Standardkurve) ermittelt und in den qRT-PCR-Analysen parallel zu der cDNA der unterschiedlichen Transformanten vermessen. Tabelle 7 zeigt exemplarisch die ermittelten Kopienzahlen des p-*gvpD*-Leserahmens in der pDpA WT- und BRE-Transformante. Es wurde sowohl die Expression unter nicht-stimulierten als auch unter pGvpE-induziert Verhältnissen ermittelt. Die erhaltenen Werte zeigten deutliche Unterschiede zwischen Transformante 1 und 2 und auch im Verhältnis zwischen pDpA WT und der BRE-Transformante.

Tabelle 7: Kopienzahlen des p-*gvpD*-Leserahmens in der pDpA WT- und BRE-Transformante. Analysiert wurden die Transkriptmengen die unter Kontrolle des nicht aktivierten (basal) und des GvpE-stimulierten (aktiviert) P_{pD} -Promotors produziert wurden. Mittels einer mitgeführten Eichreihe konnten die für die Transformanten ermittelten C_T -Werte einer Kopienzahl zugeordnet werden. Es wurden jeweils zwei unabhängige biologische Replikate (Transformante 1 und 2) miteinander verglichen.

		Transformante 1	Transformante 2
Basal Kopienzahl (x10 ³)	WT	32 ± 1,8	413 ± 59
	BRE	763 ± 47	625 ± 42
Aktiviert Kopienzahl (x10 ⁶)	WT	0,4 ± 0,02	2,8 ± 0,09
	BRE	9,9 ± 1,1	1,03 ± 0,41

Aufgrund der Schwankungen der Expressionsergebnisse war der Faktor der Reproduzierbarkeit somit nicht gegeben. Die Schwankungen können z.B. auf unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen und Fehler bei der RT-Reaktion innerhalb einer Probe zurückzuführen sein. Generell bedeutet dies ein Nachteil zu der Methode der relativen Quantifizierung, bei der die Fehler bzw. die Unterschiede gleichermaßen das Zielgen (p-*gvpD*) als auch das Referenzgen (*rpoB'*) betreffen. Diese Ergebnisse bestätigten erneut, dass die Methode der qRT-PCR für diese Analyse ungeeignet schien. Da die p-*gvpD*-Transkriptmengen in den unterschiedlichen Transformanten nicht mittels

qRT-PCR quantifiziert werden konnten, wurde im Folgenden darauf verzichtet für vergleichende Analysen die *bgaH*-Transkriptmengen mittels qRT-PCR zu ermitteln.

Die Ermittlung der basalen und pGvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivitäten der verschiedenen P_{pD} - P_{pA} -Promotorchimären erfolgte anschließend über Quantifizierung der p-*gvpD*-mRNA mittels RNA-Dot-Blot-Analysen. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, erfolgten die Analysen mit der Gesamt-RNA aus zwei unabhängigen Transformanten pro Konstrukt. Hierfür wurde jeweils 0,5 µg Gesamt-RNA seriell 1:1 verdünnt. Als Kontrolle wurde die Gesamt-RNA der *Hfx. volcanii* WFD11-Transformante pWL102+pJAS35 (pWL/pJAS) verwendet. Zur Detektion der p-*gvpD*-mRNA wurde eine strangspezifische p-*gvpD*-Sonde verwendet.

Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran des zur Untersuchung der P_{pD} -Basalaktivität durchgeführten Dot-Blots zeigte, dass von allen Transformanten ähnliche Mengen an Gesamt-RNA aufgetragen wurden (Abb. 29). Mit der Gesamt-RNA der pWL/pJAS-Transformante hybridisierte die *gvpD*-Sonde bis zu einer RNA-Konzentration von 0,125 µg (Abb. 29). Die p-*gvpD*-mRNA wurde von fast allen Transformanten, mit Ausnahme der invE+pJAS- und invE+B+T+pJAS-Transformante, in zum pDpA WT+pJAS vergleichbaren Mengen gebildet (Abb. 29). Die Inversion der intergenen Region in der invE-Mutante schien die P_{pD} -Basalaktivität etwa 4 bis 6fach zu verringern (Abb. 29). Die Inversion der intergenen Region plus den beiden Promotorelementen BRE und TATA-Box in der invE+B+T-Mutante verdoppelte die P_{pD} -Basalaktivität (Abb. 29). Die scheinbar erhöhte p-*gvpD*-Transkriptmenge in der B+T+pJAS-Transformante war auf die Auftragung einer erhöhten RNA-Konzentration zurückzuführen.

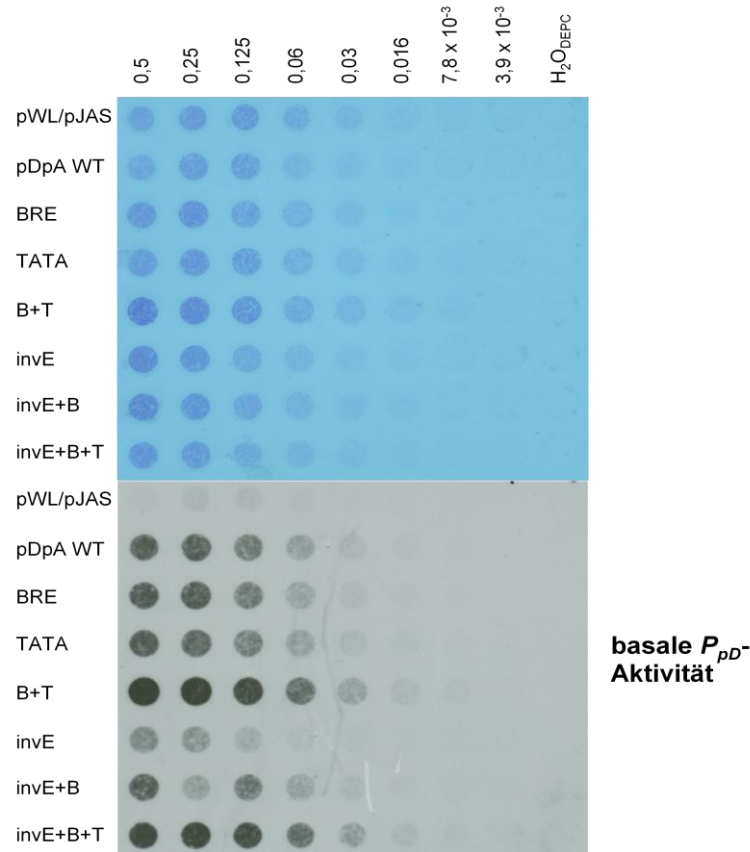


Abb. 29: Dot-Blot-Analyse zur Detektion der p-gvpD-mRNA in den *Hfx. volcanii* Doppel-Transformanten, die das entsprechende chimäre P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukt und den pJAS35-Vektor enthielten. Die p-gvpD-Transkriptmengen wurden als Maß für die P_{pD} -Aktivität analysiert. Als Negativkontrolle (=pWL/pJAS) wurde die Gesamt-RNA aus einer pWL102+pJAS35-Doppeltransformante verwendet. Die Gesamt-RNA aus den Transformanten wurde seriell 1:1 verdünnt und mit einer DIG-markierten, p-gvpD-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Die Methylenblaufärbung oben diente dem Mengenvergleich der aufgetragenen Gesamt-RNA. Die RNA-Konzentrationen sind in μg darüber angegeben.

Die Durchführung des Dot-Blots mit der Gesamt-RNA der zweiten unabhängigen Transformanten zeigte ein ähnliches Mengenverhältnis der p-gvpD-mRNA in den P_{pD} -Promotorchimären (Daten nicht gezeigt).

Für die Untersuchung der Aktivierbarkeit des P_{pD} -Promotors durch GvpE in den unterschiedlichen Promotorchimären wurden die p-gvpD-Transkriptmengen in den pDpA_{Mut}+pE^{ex}-Transformanten analysiert. Hierfür wurde ebenfalls pro Transformante eine Verdünnungsreihe der Gesamt-RNA erstellt und diese auf eine Nylonmembran transferiert. Die anschließende Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methylenblau zeigte gleichmäßig aufgetragene RNA-Mengen (Abb. 30). Mit der Gesamt-RNA der pWL/pJAS-Transformante hybridisierte die p-gvpD-Sonde bis zu einer RNA-Konzentration von 0,125 μg (Abb. 30). Die p-gvpD-mRNA wurde von allen Transformanten synthetisiert (Abb. 30). Mit Ausnahme von invE+B führten alle eingeführten Mutationen im Vergleich zum Wildtyp zu einer Erhöhung der pGvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivität.

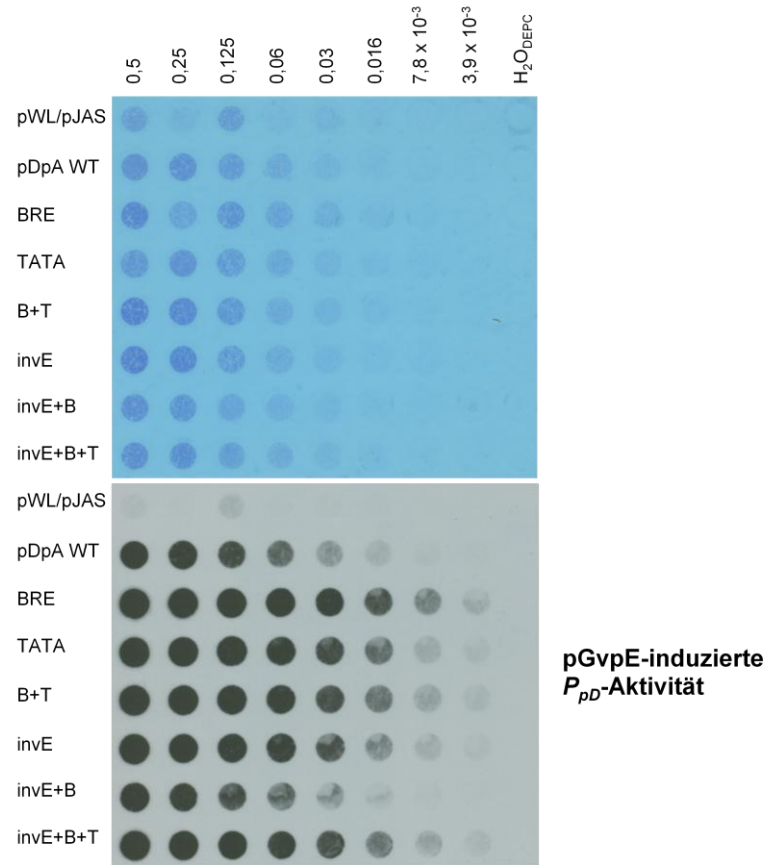


Abb. 30: Dot-Blot-Analyse zur Detektion der p-*gvpD*-mRNA in den *Hfx. volcanii* Doppel-Transformanten, die das entsprechende chimäre P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukt und pE^{ex} enthielten. Die p-*gvpD*-Transkriptmengen wurden als Maß für die P_{pD} -Aktivität analysiert. Als Negativkontrolle (=pWL/pJAS) wurde die Gesamt-RNA aus einer pWL102+pJAS35-Doppeltransformante verwendet. Die Gesamt-RNA aus den Transformanten wurde seriell 1:1 verdünnt und mit einer DIG-markierten, p-*gvpD*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Die Methylenblaufärbung oben diente dem Mengenvergleich der aufgetragenen Gesamt-RNA. Die RNA-Konzentrationen sind in μ g darüber angegeben.

Die BRE+ pE^{ex} -Transformante zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine 4 bis 6fach erhöhte GvpE-stimulierte Transkription am P_{pD} -Promotor. Eine Verdopplung der p-*gvpD*-Transkriptmengen konnte in der TATA+ pE^{ex} - und B+T+ pE^{ex} -Transformante detektiert werden. Interessanterweise verstärkte sich die P_{pD} -Aktivität in der Transformante invE+ pE^{ex} ebenfalls um den Faktor zwei trotz der um den Faktor vier verringerten Basalaktivität. Da in dieser Transformante die Aktivierung des P_{pD} -Promotors durch GvpE über die E-UAS_A erfolgte, ließ das auf einen stärker induzierenden Effekt dieser Sequenz im Vergleich zu der E-UAS_D schließen. Dagegen konnte durch Inversion der intergenen Region plus BRE-Sequenzen (invE+B) im Vergleich zum P_{pD} -Wildtypromotor in pDpA WT+ pE^{ex} keine Verstärkung der Aktivierbarkeit von P_{pD} erreicht werden. Wiederum zeigte die invE+B+T+ pE^{ex} -Transformante im Vergleich eine um den Faktor vier erhöhte P_{pD} -Stimulierung durch pGvpE.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Ermittlung der basalen und GvpE-stimulierten Promotoraktivität von P_{pD} und P_{pA} ergab folgendes Schema:

A			B		
basal	P_{pD}	P_{pA}	+pGvpE	P_{pD}	P_{pA}
BRE	WT	n.d.	BRE	4-6x +	8,5x -
TATA	WT	WT	TATA	2x +	WT
B+T	WT	n.d.	B+T	2x +	32x -
invE	4x -	WT	invE	2x +	1,8x -
invE+B	WT	WT	invE+B	WT	WT
invE+B+T	2x +	15x -	invE+B+T	4x +	2,6x -

Abb. 31: Schematische Gegenüberstellung der P_{pD} - und P_{pA} -Promotoraktivitäten der unterschiedlichen pDpA-Promotorchimären in Bezug auf den Wildtyp (WT). Eine im Vergleich zum WT schwächere Promotoraktivität ist mit -, eine verstärkte mit + angegeben. Die P_{pD} -Promotoraktivität wurde über Quantifizierung der p-gvpD-mRNA in Dot-Blot-Analysen ermittelt. Die P_{pA} -Promotoraktivität wurde über Messung der spezifischen BgaH-Aktivität mittels ONPG-Test bestimmt. Die Entnahme der Zellen für den ONPG-Test und für die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte zeitgleich aus derselben Kultur.

A: Gegenüberstellung der Basalaktivität der Promotoren P_{pD} und P_{pA} . Die Transformanten trugen das entsprechende pDpA-Promotorkonstrukt in pWL102 und den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. n.d. bedeutete keine messbare BgaH-Aktivität.

B: Gegenüberstellung der pGvpE-stimulierten Aktivität der Promotoren P_{pD} und P_{pA} . Die Transformanten trugen das entsprechende pDpA-Promotorkonstrukt in pWL102 und den p-gvpE-Leserahmen (pE^{ex}) unter Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35.

Anhand der Ergebnisse lässt sich ableiten, dass das BR-Element eine wichtige Rolle in Bezug auf die Promotoraktivität des P_{pA} -Promotors einnahm. Die Substitution von BRE_A mit der Sequenz von BRE_D hatte sowohl auf die Basalaktivität als auch auf die GvpE-induzierte Aktivität von P_{pA} einen stark reduzierenden Effekt. *Vice versa* führte die Substitution von BRE_D mit BRE_A zu einer starken Erhöhung der GvpE-induzierten P_{pD} -Aktivität. Der Austausch der TATA-Boxen hatte auf die Aktivierbarkeit der P_{pA} -TATA-Chimäre durch GvpE keinen Einfluss, resultierte jedoch in einer 2fach erhöhten GvpE-vermittelten Aktivität des chimären P_{pD} -Promotors. Die Inversion der intergenen Region in invE führte zu einer erniedrigten Basalaktivität von P_{pD} . In Gegenwart des Transkriptionsaktivators GvpE wurde der P_{pD} -Promotor dieser Mutante im Vergleich zum P_{pD} -Wildtyp jedoch 2fach stärker stimuliert. Die Aktivierung des chimären P_{pA} -Promotors in dieser Mutante war dagegen im Vergleich zum P_{pA} -Wildtyp fast 2fach reduziert. Dieses Ergebnis impliziert, dass ein Zusammenhang zwischen E-UAS-Sequenz und Stärke der GvpE-Induktion besteht. Durch den Austausch der beiden E-UAS durch Inversion der intergenen Region konnte die stärkere GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} auf den schwächeren P_{pD} -Promotor übertragen werden.

Generell zeigte sich, dass der Transfer von Promotorelementen des stärkeren P_{pA} - zum schwächeren P_{pD} -Promotor dessen Aktivität verstärkte. In Korrelation dazu resultierte der Transfer von Promotorelementen des P_{pD} - zum P_{pA} -Promotor, mit Ausnahme der TATA-Box, in einer schwächeren P_{pA} -Aktivität.

4.2 Untersuchung der Interaktionsfähigkeit verschiedener cGvpE-Mutanten mit dem Transkriptionsfaktor B (TFB)

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf einen starken Einfluss des BRE (*transcription factor B recognition element*) auf die Promotorstärke hin. Der gegenseitige Austausch der BR-Elemente von P_{pD} und P_{pA} hatte einen starken Effekt auf die basale und die durch GvpE induzierte Promotoraktivität beider Promotoren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die putative GvpE-Bindestelle nur durch ein Nukleotid vom BRE getrennt ist, und der Abstand zwischen diesen beiden Elementen für eine optimale Promotoraktivierung durch GvpE nicht variiert werden kann (Bauer *et al.*, 2008). Ebenfalls konnte eine Protein-Protein-Interaktion zwischen GvpE und Proteinen des basalen Transkriptionsapparates nachgewiesen werden: cGvpE ist fähig sowohl mit verschiedenen TATA-Boxbindeproteinen (TBP) als auch mit verschiedenen TFB-Proteinen eine Wechselwirkung einzugehen (Teufel & Pfeifer, 2010; Bleiholder *et al.*, 2011). Das führte zu der Frage, ob die Interaktion zwischen dem Transkriptionsaktivator GvpE und TFB für die GvpE-induzierte Promotoraktivierung erforderlich ist. Für die Untersuchung wurden unterschiedliche cGvpE-Mutanten auf ihre Interaktionsfähigkeit mit TFB mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie getestet. Für diese Untersuchungen wurde das cGvpE-Protein aus *Halobacterium salinarum* PHH4 verwendet, da dieses Protein von den drei c-, mc- und pGvpE-Proteinen dasjenige mit der stärksten Aktivatorfunktion ist (Gregor & Pfeifer, 2001; Bauer *et al.*, 2008) und bereits verschiedene Mutanten ohne Aktivatorfunktion vorhanden sind (Plöber & Pfeifer, 2002; Anderl, 2004). Als Interaktionspartner für die verschiedenen cGvpE-Mutanten wurde das TfbC Protein aus *Halobacterium salinarum* NRC-1 verwendet, da mit diesem Protein die stärkste Interaktionsfähigkeit mit GvpE detektiert wurden (Bleiholder *et al.*, 2011).

Zu Beginn der Durchführung der cGvpE/TfbC-Interaktionsstudien lag das Augenmerk auf bereits vorhandenen und ihre Aktivatorfunktion hin getesteten cGvpE-Proteinen. Es handelt sich hierbei um cGvpE-Proteine mit Mutationen in der amphiphilen α -Helix 4 (AH4), der amphiphilen α -Helix 6 (AH6) oder konservierten Aspartat-Resten in der Region zwischen den Aminosäuren 50 und 100 (Plöber & Pfeifer, 2002; Anderl, 2004). Basierend auf *molecular modelling* Studien des C-terminalen Bereichs des cGvpE-Proteins wird ein basisches Leucinzipper-Motiv (bZIP) in der AH6 vorgeschlagen (Abb. 32; Krüger

et al., 1998), welches an der Ausbildung eines möglichen aktiven cGvpE-Dimers beteiligt ist (Krüger *et al.*, 1998; Plöber und Pfeifer, 2002).

1	<u>MDDL</u> LAELKSEMDAAGVDADVEFSLPTLELTAALDATIDDTSQLYTDDPP	50
	AH1	
51	HHYTDTPLTG <u>DDLPLLEAW</u> LDDAQLHGVGDDIIAEYIDEVLLVLITVRGG	100
	H2 AH3	
101	ACG <u>KELLQDVRR</u> LFGADVSPGTMYPHLKQLADAGLLEMSELT <u>KRKVYR</u> VA	150
	AH4 H5 DNAB	
151	DAQAAIEH <u>VDSVVLQ</u> LLTFAVG <u>LQ</u> TIMAD <u>C</u> IVNQSADPQPQDE	193
	AH6 (Leucinzipper)	

Abb. 32: Aminosäuresequenz sowie vorhergesagte Sekundärstruktur des cGvpE-Proteins (Krüger *et al.*, 1998). Prognostizierte α -Helices (mit H markiert) bzw. amphiphile α -Helices (mit AH markiert) sind unterstrichen und mit AH1 bis AH6 gekennzeichnet. Die hydrophoben Kernamino­säuren innerhalb des Leucinzippers sind fett und kursiv. Das putative DNA-Bindemotiv (DNAB) ist grau hinterlegt und die basischen Kernamino­säuren in fett gekennzeichnet. Die basischen Aminosäuren der AH4-Region, die möglicherweise ein weiteres DNA-Bindemotiv bilden sind ebenfalls fett gedruckt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Cysteinrest an Position 180 innerhalb des bZIP-Motivs nicht an der Aktivatorfunktion des cGvpE-Proteins beteiligt ist, während die Aminosäurereste Valin 159, Leucin 166 und Leucin 173 in der AH6 für die Aktivatorfunktion essentiell sind (Abb. 33; Plöber und Pfeifer, 2002).

cGvpE	159- <u>V</u> DSVVLQ <u>L</u> LTFAVG <u>LQ</u> TIMAD <u>C</u> -180	+
E _{zip} C180LL	+
E _{zip} C180DD	+
E _{zip} L173E/C180LE.....L	-
E _{zip} L166EE.....	-
E _{zip} V159D	D.....	-

Abb. 33: Sequenz des Leucinzipper-Motivs in der AH6 von cGvpE (oben) und der verschiedenen Substitutionsmutanten. Die zentralen Aminosäuren des putativen bZIP-Motivs sind unterstrichen. Punkte markieren die Aminosäuren, die mit der oben angegebenen cGvpE-Sequenz identisch sind. Die Fähigkeit der verschiedenen cGvpE-Mutanten den P_A -Promotor zu aktivieren ist rechts in Form von +/- angegeben (Plöber & Pfeifer, 2002).

Die N-terminal zur AH6-Region liegende AH4 beinhaltet eine basische Region mit dem Motiv 104-**KELLQDVRR**-112. Da die AH4-Region zwischen den GvpE-Sequenzen unterschiedlicher Organismen stark konserviert ist und sich in räumlicher Nähe zu dem oben genannten bZIP-Motiv befindet, ist sie möglicherweise an der GvpE-DNA-Interaktion beteiligt (Krüger *et al.*, 1998). Die Substitution der basischen Aminosäure Lysin 104 in der AH4-Region führt zu einem GvpE-Protein, das den P_A -Promotor *in vivo* nicht mehr aktivieren kann (Abb. 34; Plöber & Pfeifer, 2002). Substitutionen der basischen Aminosäuren Arginin 111 und 112 spielen dagegen keine Rolle bei der GvpE-Aktivierung (Abb. 34; Plöber & Pfeifer, 2002).

cGvpE	104- <u>K</u> ELLQDV <u>RR</u> -112	+
E _{AH4} AAA	A.....AA	-
E _{AH4} K104A/R112A	A.....A	-
E _{AH4} K104A	A.....	-
E _{AH4} R111A/R112AAA	+
E _{AH4} R111AA.	+
E _{AH4} R112AA	+

Abb. 34: Sequenz der basischen Region innerhalb der AH4 von cGvpE (oben) und der verschiedenen Substitutionsmutanten. Die basischen Aminosäuren sind unterstrichen. Punkte markieren die Aminosäuren, die mit der oben angegebenen cGvpE-Sequenz identisch sind. Die Fähigkeit der verschiedenen cGvpE-Mutanten den P_A -Promotor zu aktivieren ist rechts in Form von +/- angegeben (Plöber & Pfeifer, 2002).

Die Rolle verschiedener konservierter Aspartatrete in der Region 50-100 von cGvpE für die Aktivierung des P_A -Promotors und die Proteinstabilität wurde ebenfalls bereits untersucht (Anderl, 2004). Die cGvpE-Mutanten enthielten eine Substitutionen des konservierten Aspartatrests, bzw. der konservierten Aspartatrete D55 (Mut-1), DD71,72 (Mut-2) oder D88 (Mut-3) zu Alanin (Abb. 35).

Die Substitution des Aspartatrests an Position 88 der GvpE-Sequenz führt zu einem Verlust der Aktivierungsfähigkeit von cGvpE *in vivo* (Anderl, 2004). Dagegen können Mut-1 und Mut-3 als Transkriptionsaktivator agieren. Die Mutationen D55A und DD71,72AA haben somit keinen Einfluss auf die Aktivatorfunktion (Anderl, 2004).

cGvpE	50-HHYT <u>D</u> TPLTGDDLPLEAWL <u>DD</u> AQLHGVGDDIIAEYI <u>D</u> EVLLVLITVRGG-100	+
Mut-1	50-....A.....-100	+
Mut-3	50-.....AA.....-100	+
Mut-5	50-.....A.....-100	-

Abb. 35: Teilbereich der Aminosäuresequenz von cGvpE (oben) und der verschiedenen Substitutionsmutanten. Die konservierten Aspartatreste sind unterstrichen. Punkte markieren die Aminosäuren, die mit der oben angegebenen cGvpE-Sequenz identisch sind. Die Fähigkeit der verschiedenen cGvpE-Mutanten den P_A -Promotor zu aktivieren ist rechts in Form von +/- angegeben (Anderl, 2004).

4.2.1 Interaktionsstudien mit TfbC und den cGvpE-Mutanten (cGvpE_{AH4}, cGvpE_{Zip} oder cGvpE_{Asp})

Alle vorhandenen cGvpE-Mutanten wurden in dieser Arbeit auf ihre Interaktionsfähigkeit mit dem TfbC-Protein getestet. Die Interaktionsstudien sollten erste Hinweise darauf liefern, welche Aminosäuren des cGvpE-Proteins eventuell an der GvpE/TFB-Interaktion beteiligt sind. Besonders interessant sind diejenigen cGvpE-Proteine, die aufgrund der eingeführten Mutationen ihre Aktivatorfunktion verloren haben. Gesetzt dem Fall, dass diese Mutanten auch ihre Fähigkeit zur Interaktion mit TfbC verloren hätten, würde das einen weiteren Hinweis auf die Notwendigkeit einer GvpE/TFB-Interaktion für die Promotoraktivierung geben.

Für die Interaktionsexperimente mittels Affinitätschromatographie wurde TfbC_{His} mit einem C-terminalen His-tag in *E. coli* BL21 produziert. Als Negativ-Kontrolle wurde für jede cGvpE-Mutante eine Affinitätschromatographie mit dem Gasvesikelprotein pGvpH (aus *Halobacterium salinarum* PHH1) durchgeführt. Das diente dem Nachweis, dass die verschiedenen cGvpE-Proteine nicht unspezifisch an andere Proteine binden konnten, sondern dass es sich bei der cGvpE/TfbC-Wechselwirkung um eine spezifische Interaktion handelte. Das pGvpH_{His}-Protein wurde mit einem N-terminalen His-tag in *E. coli* M15 produziert. Die Reinigung der rekombinant produzierten Proteine erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen. Um die His-Fusionsproteine in ihre native, unter Hochsalzbedingungen vorliegende Konformation zu überführen, wurde eine schrittweise Rückfaltung durch Dialyse durchgeführt. Die Dialyse erfolgte bis zu einer Endkonzentration von 2,5 M Kaliumchlorid (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Die Verwendung von KCl ist begründet durch die von den Halobakterien durchgeführte *salt-in*-Strategie, bei der im Cytoplasma zum Außenmedium isoosmotische Konzentrationen von KCl vorhanden sind (Dennis & Shimmin, 1997). Die meisten halobakteriellen Proteine benötigen für ihre Stabilität und Aktivität sogar hohe KCl-Konzentrationen (Kushner, 1985; Grant & Larsen, 1989). Eine erfolgreiche Rückfaltung unter vergleichbaren Bedingungen konnte für das TBP-Protein aus *Hbt. salinarum* (Soppa

& Link, 1997) und die Glukosedehydrogenase aus *Hfx. mediterranei* (Pire *et al.*, 2001) gezeigt werden und wurde bereits bei den Untersuchungen zur Interaktionsfähigkeit von GvpE mit verschiedenen TBPs bzw. TFBs verwendet (Teufel & Pfeifer 2010; Bleiholder *et al.*, 2011).

Für die Herstellung von Affinitätschromatographiematrices zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte die Immobilisierung des rückgefalteten TfbC_{His}- bzw. pGvpH_{His}-Proteins an Ni-NTA-Agarose. Diese beladenen Matrices wurden mit den löslichen Proteinen der Zelllysate von *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die unterschiedlichen cGvpE-Mutanten produzierten, inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution des His-Fusionsproteins mit dem eventuell gebundenen Interaktionspartner. Die letzte Waschfraktion und die Elutionsfraktionen der Interaktionsexperimente wurden elektrophoretisch in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit cGvpE-Antiserum inkubiert. Zusätzlich zu der als Kontrolle mitgeführten pGvpH-beladenen Ni-NTA-Matrix diente eine unbeladene Ni-NTA-Matrix als weitere Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde eine TfbC_{His}-Matrix mit dem Zelllysate einer cGvpE-Transformante inkubiert, die den nativen c-gvpE-Leserahmen in pJAS35 enthielt.

Um eine eventuelle Beteiligung der basischen Aminosäuren in der AH4-Region von cGvpE an der Interaktion mit TfbC zu untersuchen, wurden die sechs Substitutionsmutanten cE_{AH4}AAA, cE_{AH4}K104A/R112A, cE_{AH4}K104A, cE_{AH4}R111A/R112A, cE_{AH4}R111A und cE_{AH4}R112A für Interaktionsstudien eingesetzt. Für alle sechs cGvpE-Mutanten konnte eine spezifische Interaktion mit TfbC nachgewiesen werden (Abb. 36). Eine Interaktion mit pGvpH erfolgte dagegen in keinem der Fällen (Abb. 36 B und Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion der cGvpE-Mutanten mit den unbeladenen Kontrollmatrices erfolgte ebenfalls nicht (Abb. 36 A, B und Daten nicht gezeigt).

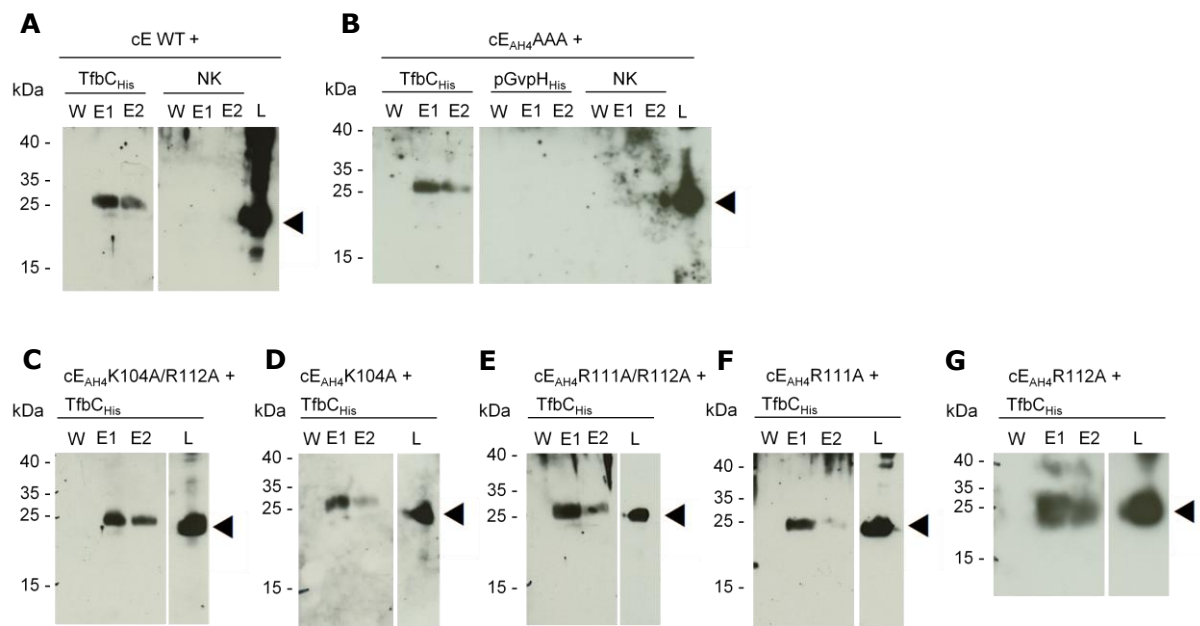


Abb. 36: Western-Analyse der Elutionsfraktionen von Affinitätschromatographien verschiedener cGvpE-Mutanten mit TfbC_{His}-Matrices. In (A) und (B) sind jeweils auch die entsprechenden Fraktionen der Negativkontrolle (Inkubation eines cGvpE-Lysats mit einer unbeladenen Ni-NTA-Matrix; mit NK gekennzeichnet) aufgetragen. In (B) sind des Weiteren zusätzlich die entsprechenden Fraktionen des Kontroll-experiments (Interaktionsstudie einer pGvpH_{His}-Matrix mit cGvpE_{Mut}) aufgetragen. Die Positivkontrolle (Interaktionsstudie einer TfbC_{His}-Matrix mit nativem cGvpE) ist mit cE WT bezeichnet. Es wurden jeweils 15 µl der Elutionsfraktionen (E1, E2) und der letzten Waschfraktion (W) aufgetragen. Als Ladekontrolle (L) wurden je 20 µg (A) bzw. 10 µg (B-G) lösliches Protein der unterschiedlichen Zelllysate aufgetragen. Die Proben wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit cGvpE-Antiserum inkubiert. Pfeile markieren die Position der jeweiligen cGvpE-Varianten. Die molaren Massen des Proteingrößenstandards sind jeweils links in kDa angegeben.

Eine Beteiligung der basischen Aminosäuren in der AH4-Region von cGvpE an der Interaktion mit TfbC konnte somit ausgeschlossen werden. Der Verlust der Aktivatorfunktion von cE_{AH4}AAA, cE_{AH4}K104A/R112A, cE_{AH4}K104A ist demnach nicht auf eine fehlende TfbC-Interaktion zurückzuführen.

Des Weiteren wurde die Interaktionsfähigkeit der cGvpE_{Zip}-Mutanten C180L, C180D, L173E/C180L, L166E und V159D analysiert. Auch für diese Mutanten konnte eine spezifische Interaktion mit TfbC nachgewiesen werden (Abb. 37). Allerdings ergab die Untersuchung zur Interaktionsfähigkeit der cGvpE-Mutante E_{Zip}L166E erst im dritten Versuch ein schwaches Signal (Abb. 37 E). Auch hier erfolgte keine Bindung der cGvpE-Mutanten an eine GvpH_{His}-Matrix (Abb. 37 B und Daten nicht gezeigt) und eine unbeladene Kontrollmatrix (Abb. 37 A, B und Daten nicht gezeigt).

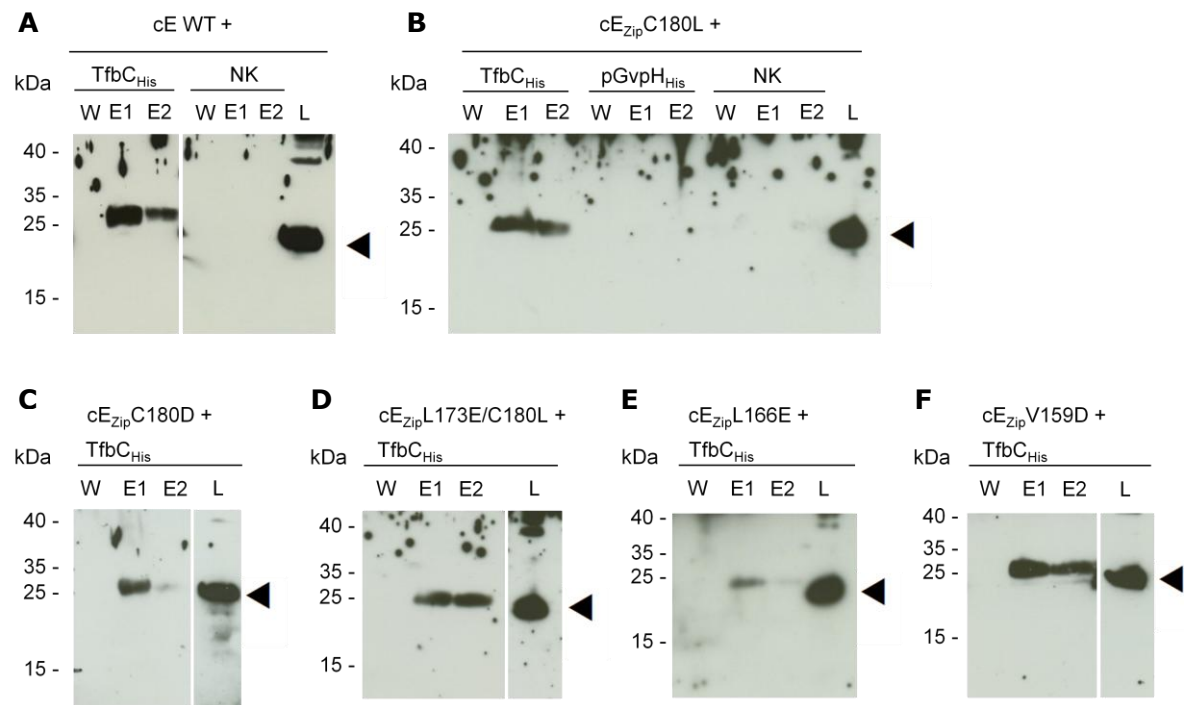


Abb. 37: Western-Analyse der Elutionsfraktionen von Affinitätschromatographien verschiedener cGvpE-Mutanten mit TfbC_{His}-Matrices. In (A) und (B) sind jeweils auch die entsprechenden Fraktionen der Negativkontrolle (Inkubation eines cGvpE-Lysats mit einer unbeladenen Ni-NTA-Matrix; mit NK gekennzeichnet) aufgetragen. In (B) sind des Weiteren zusätzlich die entsprechenden Fraktionen des Kontrollversuchs (Interaktionsstudie einer pGvpH_{His}-Matrix mit cGvpE_{Mut}) aufgetragen. Die Positivkontrolle (Interaktionsstudie einer TfbC_{His}-Matrix mit nativem cGvpE) ist mit cE WT bezeichnet. Es wurden jeweils 15 µl der Elutionsfraktionen (E1, E2) und der letzten Waschfraktion (W) aufgetragen. Als Ladekontrolle (L) wurden je 10 µg lösliches Protein der unterschiedlichen Zelllysate aufgetragen. Die Proben wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit cGvpE-Antiserum inkubiert. Pfeile markieren die Position der jeweiligen cGvpE-Varianten. Die molaren Massen des Proteingrößenstandards sind jeweils links in kDa angegeben.

Die Schwierigkeiten bei dem Nachweis der E_{Zip}L166E/TfbC-Interaktion könnten ein Hinweis darauf sein, dass dieser Aminosäurerest an der Ausbildung der Interaktion beteiligt ist.

Weiterhin wurden die cGvpE-Mutanten Mut-1, Mut-3 und Mut-5 mit Substitutionen von konservierten Aspartatresten in der Region zwischen Position 50 und 100 der cGvpE-Sequenz untersucht. Im Zentrum des Interesses lag die Mutante Mut-5, die im Zuge der Substitution des Aspartatrestes an Position 88 die Aktivatorfunktion verloren hatte (Anderl, 2004). Auch hier konnte für alle drei Mutanten eine spezifische Interaktion mit TfbC nachgewiesen werden (Abb. 38), während keine dieser cGvpE-Mutanten an GvpH_{His}-Matrices und unbeladene Kontrollmatrices band (Abb. 38 A und Daten nicht gezeigt).

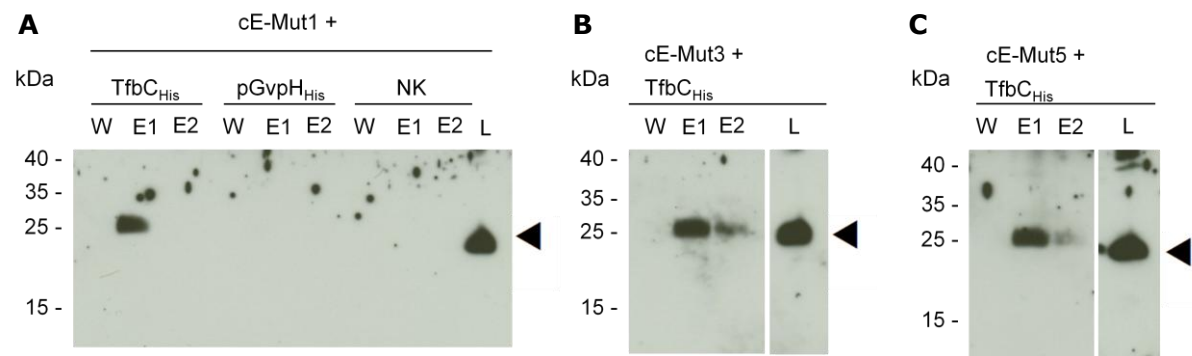


Abb. 38: Western-Analyse der Elutionsfraktionen von Affinitätschromatographien verschiedener cGvpE-Mutanten mit TfbC_{His}-Matrices. In (A) sind auch die entsprechenden Fraktionen der Kontrollreaktionen (Inkubation eines cGvpE-Lysats mit einer pGvpH_{His}- bzw. unbeladenen Ni-NTA-Matrix, =NK) aufgetragen. Es wurden jeweils 15 µl der Elutionsfraktionen (E1, E2) und der letzten Waschfraktion (W) aufgetragen. Als Ladekontrolle (L) wurden je 10 µg lösliches Protein der unterschiedlichen Zelllysate aufgetragen. Die Proben wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit cGvpE-Antiserum inkubiert. Pfeile markieren die Position der jeweiligen cGvpE-Varianten. Die molaren Massen des Proteingrößenstandards sind jeweils links in kDa angegeben.

Zusammenfassen kann man sagen, dass weder die basischen Aminosäuren innerhalb der AH4, noch die zentralen Aminosäuren des bZIP-Motivs oder die konservierten Aspartatreste in der Region zwischen den Aminosäuren 50 und 100 an der Interaktion mit TfbC beteiligt sind. Die Schwierigkeit des Nachweises der cE_{Zip}-L166E/TfbC-Interaktion könnte auf eine mögliche Beteiligung dieses Leucin-Rests an der Interaktion hinweisen.

4.2.2 Herstellung von weiteren cGvpE-Substitutionsmutanten und Untersuchung ihrer aktivierenden Funktion

Es wurden weitere cGvpE-Substitutionsmutanten generiert, diese auf ihre Aktivatorfunktion hin überprüft und die Interaktionsfähigkeit mit TfbC untersucht. Dafür wurden vier weitere konservierte Aminosäuren die die AH4-Region und die AH6- des cGvpE-Proteins flankieren substituiert (Abb. 39). Dabei ist einer (Y147) der vier Reste in der putativen DNA-Binderegion (DNAB) vor dem bZIP-Motiv lokalisiert.

		D117	Y124		Y147	D151
		↓	↓		↓	↓
c-vac	100-GACG K ELLQDV RR LFGADVSPGTMYPHLKQLADAGLLEMSELTKRKVYRVAD					
mc-vac	100-GACG K ELLQDI RR LFGTDLSPGTVYPHLNDLADEGMLDMTELAKRKVYRISD					
p-vac	100-GACG K ELLQDL RR LFGADLSPGTVYPHLNDLAVEGVLEVQKLSKRKVYRLSD					
	<u> AH4 </u>			<u> H5 </u>		<u> DNAB </u>
c-vac	AQAAIEHVDSVVLQ LL TFAVGLQ T IMAD C IVNQSADPQPQDE-193					
mc-vac	AEATFDT V EPAVNR L VT F SLV L KALMID C NARYLQTQ R SESNER-195					
p-vac	PEGAFTR I DHMVDQ LL LFSLV L KAVMTD C KARQSQSQGRETN-194					
	<u> AH6 </u>					

Abb. 39: Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenz von GvpE aus der c-vac, mc-vac und p-vac-Region. Die amphiphilen α -Helices (AH) 4 und 6 sind unterstrichen, die α -Helix 5 (H5) ist mit unterbrochener Linie markiert. Die basischen Aminosäuren der AH4 und die Schlüsselaminosäuren des bZIP-Motivs in der AH6 sind fett gedruckt. Die DNA-Binderegion ist ebenfalls unterstrichen und mit DNAB gekennzeichnet. Die zu substituierenden, konservierten Aspartat- und Tyrosin-Rest sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und grau hinterlegt.

Durch ortsspezifische Mutagenese-PCR wurde der negativ geladene, polare Aspartatrest D117 oder D151, bzw. die polaren Tyrosinreste Y124 oder Y147 gezielt durch die kleine, ungeladene und neutrale Aminosäure Alanin ersetzt. Die Aminosäuren Aspartat und Tyrosin haben aufgrund ihrer Seitenketten eine besondere Bedeutung für die Ausbildung von elektrostatischen Wechselwirkungen (D, Y) und Wasserstoffbrückenbindungen (Y). Der Austausch des negativ geladenen, polaren Aspartats und des aromatischen, polaren Tyrosins gegen das ungeladene Alanin sollte die möglichen Wechselwirkungen innerhalb des cGvpE-Proteins oder auch die Interaktion mit TfbC schwächen oder aufheben und damit womöglich die Aktivatorfunktion von cGvpE beeinträchtigen.

Für die Herstellung der verschiedenen cGvpE-Mutanten wurde der *c-gvpE*-Leserahmen durch ortsspezifische Mutagenese-PCR mit *c-gvpE* in pBIIKS+ (Armbruster, 1997) als Matrize modifiziert. Die Substitution des entsprechenden Aminosäurerests durch Alanin erfolgte durch Punktmutation in der DNA-Sequenz von *c-gvpE*. Die erhaltenen Plasmidkonstrukte wurden jeweils durch DNA-Sequenzanalysen überprüft. Die modifizierten *c-gvpE*-Leserahmen wurden als *NcoI*-*Acc65I*-Fragment in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 inseriert. Um die aktivierende Funktion der cGvpE-Mutanten zu untersuchen, erfolgte die Doppeltransformation von *Hfx. volcanii* mit dem entsprechenden cGvpE_{Mut}-Fragment in pJAS35 und dem *P_{pA}*-Promotor fusioniert mit dem *bgaH*-Leserahmen (pA-*bgaH* x pWL102; Gregor, 2002). Für diese Studie wurde der *P_{pA}*-Promotor gewählt, da dieser durch cGvpE stärker induziert wird, als der homologe *P_{CA}*-Promotor (Gregor & Pfeifer, 2001). Die *P_{pA}*-Basalaktivität wurde in *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten ermittelt, die das Konstrukt pA-*bgaH* x pWL102 und den Vektor pJAS35 trugen. Für die Untersuchung wurden die verschiedenen Doppeltransformanten in

3 M NaCl-Medium bei 180 upm und 37° C schüttelnd für 72 h inkubiert. Die Plasmide der Transformanten wurden isoliert und mittels Restriktions- oder Southern-Analyse auf ihre Richtigkeit kontrolliert. Von jeder Transformante wurde eine Wachstumskurve aufgenommen und nach 54 h Wachstum die spezifische BgaH-Aktivität mittels ONPG-Test ermittelt. Die gemittelten spezifischen BgaH-Aktivitäten sind in Abb. 40 in Form eines Säulendiagramms dargestellt. Für die P_{pA} -Basalaktivität wurde ein Wert von $1,5 \pm 1,2$ mU/mg ermittelt. Die Aktivität des P_{pA} -Promotors in der pA-*bgaH*+cE WT-Transformante wurde durch cGvpE um das 41fache auf 62 mU/mg stimuliert. Insgesamt konnte für die pA-*bgaH*+cE_{Mut}-Transformanten ein relativ einheitliches Ergebnis erhalten werden: In den Transformanten pA-*bgaH*+cED117A (70 ± 9 mU/mg), pA-*bgaH*+cEY147A (79 ± 6 mU/mg) und pA-*bgaH*+cED151A (69 ± 6 mU/mg) wurde eine ähnliche spezifische BgaH-Aktivität ermittelt wie in der pA-*bgaH*+cE WT-Transformante. Die spezifische BgaH-Aktivität der pA-*bgaH*+cEY124A-Transformante ($2,5 \pm 0,4$ mU/mg) lag dagegen im Bereich der basalen Aktivität des P_{pA} -Promotors. Dies bedeutet, dass der konservierte Tyrosin-Rest an Position 124 der cGvpE-Sequenz für die Aktivatorfunktion von cGvpE wichtig ist.

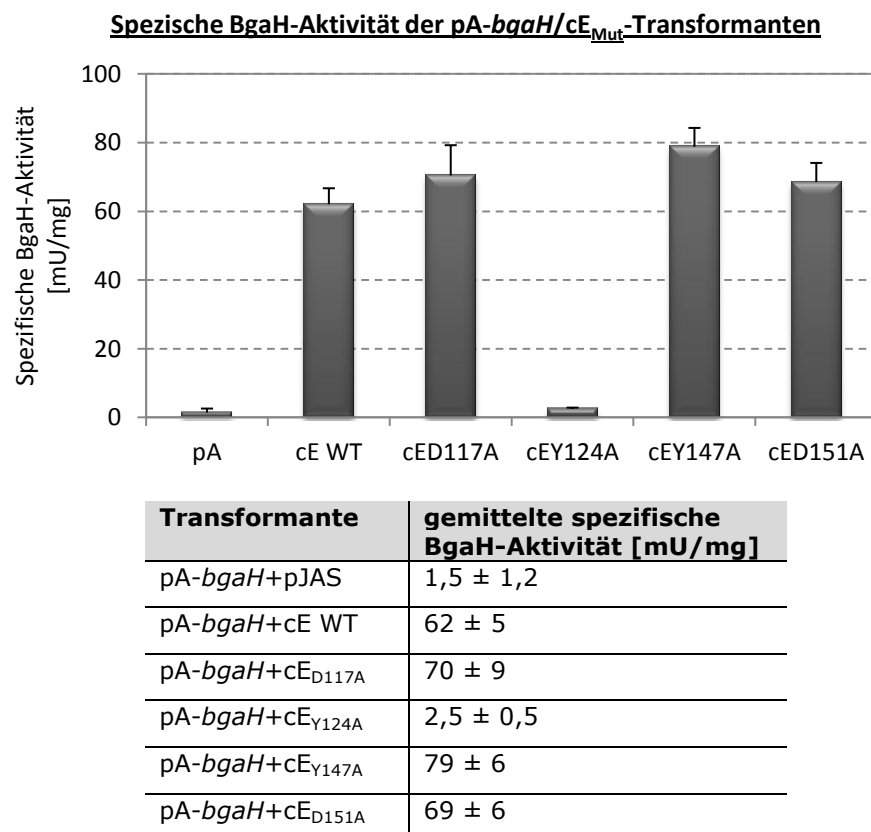


Abb. 40: Spezifische BgaH-Aktivitäten der *Hfx. volcanii*-Doppel-Transformanten mit dem Reportergenkonstrukt pA-*bgaH* x pWL102 und dem Vektor pJAS35 (pA), dem Konstrukt cE_{WT} x pJAS35 (cE WT) oder einem der jeweiligen cE_{Mut}-Konstrukte in pJAS35 (cED117A-cED151A). Die Werte der spezifischen BgaH-Aktivität mit den entsprechenden Standardabweichungen sind in der Tabelle unter dem Diagramm angegeben.

Um auszuschließen, dass die reduzierte spezifische BgaH-Aktivität auf Translationsprobleme zurückzuführen war, wurde eine Northern-Analyse mit einer strangspezifischen *bgaH*-Sonde durchgeführt. In allen Transformanten konnte den BgaH-Aktivitäten zuordenbare *bgaH*-Transkriptmengen nachgewiesen werden (Abb. 41). In den Doppel-Transformanten pA-*bgaH*+cE WT, pA-*bgaH*+cED117A, pA-*bgaH*+cEY147A und pA-*bgaH*+cED151A wurden vergleichbare Mengen an *bgaH*-mRNA (und deren kürzere Abbauprodukte) gebildet. Dagegen wurde in der Transformante pA-*bgaH*+cEY124A deutlich weniger *bgaH*-mRNA detektiert. Die in pA-*bgaH*+cEY124A gebildeten Transkriptmengen entsprachen denen der Transformanten pA-*bgaH*+pJAS. Demnach konnte der P_{pA} -Promotor in pA-*bgaH*+cEY124A nicht durch diese cGvpE-Mutante aktiviert werden.

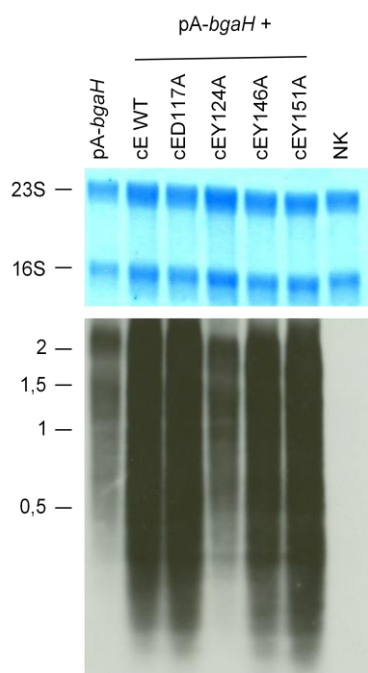


Abb. 41: Northern-Analyse zum Nachweis der *bgaH*-Transkripte in den pA-*bgaH*+pJAS35-, pA-*bgaH*+cE WT- und pA-*bgaH*+cE_{Mut}-Transformanten. Die dazugehörige Kontrollfärbung der Nylonmembran mit Methylenblau ist darüber gezeigt. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus der frühstationären Wachstumsphase über ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einer DIG-markierten, strangspezifischen *bgaH*-Sonde. NK=Negativkontrolle. Angabe der RNA-Größenstandards auf der linken Seite. Der Pfeil markiert die *bgaH*-Transkripte.

Um die Expression der verschiedenen modifizierten c-*gvpE*-Leserahmen in den Transformanten zu überprüfen, wurde parallel zur Bestimmung der spezifischen BgaH-Aktivität Proben für die Protein-Isolierung entnommen. Aus den Zelllysaten wurde die lösliche Proteinfraction isoliert und damit eine Western-Analyse mit einem spezifischen cGvpE-Antiserum durchgeführt. Die Western-Analyse diente gleichzeitig dem Nachweis, dass die eingeführten Mutationen die Stabilität des cGvpE-Proteins nicht negativ beeinflussten.

Die Western-Analyse der löslichen Proteine der Zelllysate der fünf pA-*bgaH*+cE-Transformanten zeigte, dass die cGvpE-Proteine in allen Transformanten synthetisiert wurden und stabil vorlagen (Abb. 42). Beim Beladen des SDS-Gels konnte von pA-

bgaH+cEY147A nicht die gesamte vorgesehene Proteinmenge aufgetragen werden, da ein großer Bereich der Tasche durch Acrylamid-Reste verstopft war. Daraus resultierte die im Verhältnis reduzierte Proteinmenge.

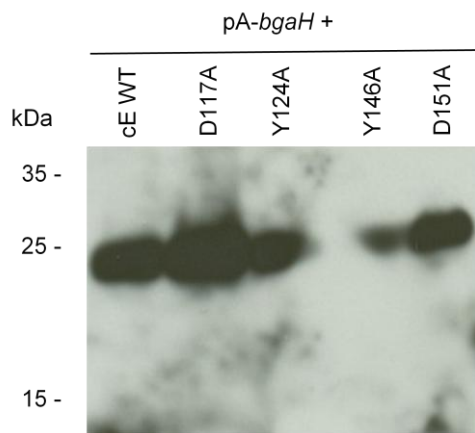


Abb. 42: Western-Analyse zum Nachweis von cGvpE und cGvpE_{Mut} in den pA-*bgaH*+cE-Doppeltransformanten. Je 20 µg der löslichen Proteine der Zelllysate der *Hfx. volcanii*-Transformanten wurden mit einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit cGvpE-spezifischen Antiserum inkubiert. Die molaren Massen des Protein-Größenstandards sind links in kDa angegeben.

4.2.3 Interaktionsstudien der cGvpE-Substitutionsmutanten mit TfbC

Wäre einer der substituierten Aspartat- oder Tyrosinreste an der Interaktion zwischen cGvpE und TfbC beteiligt, sollte die entsprechende cGvpE-Mutante in den Eluaten der Interaktionsstudien nicht oder nur schwach nachweisbar sein. Für die Interaktionsexperimente wurden die Proteine TfbC und pGvpH wie in den vorherigen Experimenten rekombinant in *E. coli* als His-*tag*-Fusionsproteine produziert, unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und rückgefaltet. Für die Protein-Protein-Interaktionsexperimente wurden TfbC_{His}-Matrices und als Negativkontrolle pGvpH_{His}-Matrices hergestellt. Diese Matrices wurden mit den löslichen Proteinen der Zelllysate von *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die unterschiedlichen cGvpE-Mutanten produzierten, inkubiert. Die letzte Waschfraktion und die Elutionsfraktionen der Interaktionsexperimente wurden elektrophoretisch in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit cGvpE-Antiserum inkubiert. Zusätzlich zu der pGvpH-beladenen Ni-NTA-Matrix wurde eine unbeladene Ni-NTA-Matrix als weitere Negativkontrolle mitgeführt.

Die Ergebnisse der Interaktionsexperimente sind in Abb. 43 zusammengefasst. Für alle vier cGvpE-Mutanten D117A, Y124A, Y147A und D151A konnte eine spezifische Interaktion mit TfbC nachgewiesen werden, wobei die Untersuchung zur Interaktionsfähigkeit der cGvpE-Mutante D117A erst im dritten Versuch ein schwaches Signal ergab (Abb. 43 B).

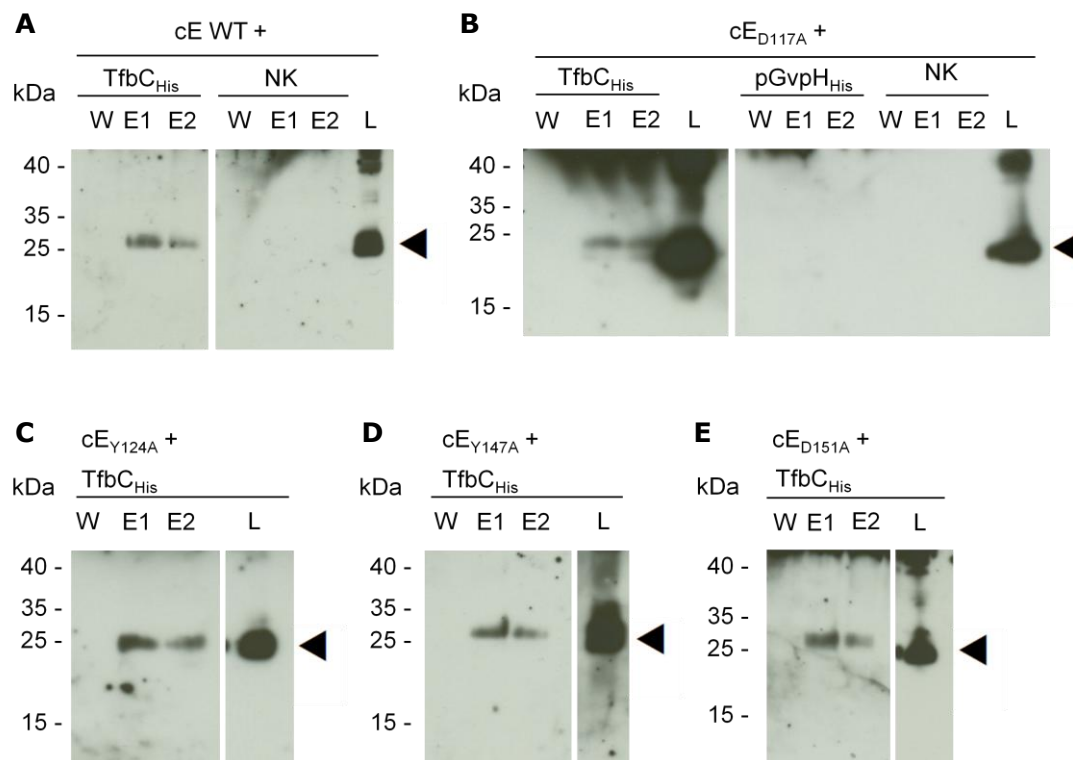


Abb. 43: Western-Analyse der Elutionsfraktionen von Affinitätschromatographien verschiedener cGvpE-Mutanten mit TfbC_{His}-Matrices. In (A) und (B) sind jeweils auch die entsprechenden Fraktionen der Negativkontrolle (Inkubation eines cGvpE-Lysats mit einer unbeladenen Ni-NTA-Matrix; mit NK gekennzeichnet) aufgetragen. In (B) sind des Weiteren zusätzlich die entsprechenden Fraktionen des Kontrolllexperiments (Interaktionsstudie einer pGvpH_{His}-Matrix mit cGvpE_{Mut}) aufgetragen. Die Positivkontrolle (Interaktionsstudie einer TfbC_{His}-Matrix mit nativem cGvpE) ist mit cE WT bezeichnet. Es wurden jeweils 15 µl der Elutionsfraktionen (E1, E2) und der letzten Waschfraktion (W) aufgetragen. Als Ladekontrolle (L) wurden je 10 µg lösliches Protein der unterschiedlichen Zelllysate aufgetragen. Die Proben wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit cGvpE-Antiserum inkubiert. Pfeile markieren die Position der jeweiligen cGvpE-Varianten. Die molaren Massen des Proteingrößenstandards sind jeweils links in kDa angegeben.

Bei den Affinitätschromatographien mit gebundenem pGvpH_{His} konnte in den Western-Analysen kein cGvpE-Protein nachgewiesen werden (Abb. 43 B und Daten nicht gezeigt). Mit der als Negativkontrolle mitgeführten unbeladenen Ni-NTA-Matrix fand ebenfalls keine Wechselwirkung statt (Abb. 43 A, B und Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die in die cGvpE-Sequenz eingeführten Mutationen nicht zu Wechselwirkungen der cGvpE-Mutanten mit unspezifischen Proteinen oder der Ni-NTA-Matrix führten. Demnach waren alle Interaktionen zwischen TfbC und den verschiedenen cGvpE-Mutanten als spezifisch anzusehen. Die Schwierigkeiten bei dem Nachweis der cE_{D117A}/TfbC-Interaktion könnten ein Hinweis darauf sein, dass dieser Aminosäurerest für die Ausbildung der Interaktion wichtig ist.

Fasst man die Ergebnisse aller Interaktionsstudien zusammen, konnte eine Beteiligung der basischen Aminosäuren innerhalb der AH4-Region an der cGvpE/TfbC-Interaktion

ausgeschlossen werden. Ebenfalls nicht an der Interaktion beteiligt waren die konservierten Aspartatreste D55, D71, D72 und D88 und die Schlüsselaminosäuren des bZIP-Motivs des cGvpE-Proteins. Eine Ausnahme bildete hierbei der Leucin-Rest L166 des bZIP-Motivs, dessen Substitution durch die Aminosäure Glutamat zu Schwierigkeiten bei Nachweis der Interaktion von cGvpE mit TfbC führten. Die cGvpE-Substitutionsmutanten D117A, Y124A, Y147A und D151A konnten ebenfalls mit Hilfe der TfbC_{His}-Affinitätschromatographiematrices aus den Zelllysaten der entsprechenden WFD11-Transformanten isoliert werden. Die Schwierigkeit beim Nachweis der cE_{D117A}/TfbC-Interaktion lässt vermuten, dass der konservierte Aspartatrest D117 entweder für die vollständige Ausbildung der Interaktion notwendig war, oder die gewählte Substitution zu einer so ungünstigen Konformation des Proteins führte, die in einer reduzierten Interaktionsfähigkeit resultierte.

5 Diskussion

Der Gasvesikelbildung in *Hbt. salinarum* PHH1 liegt die Expression der in der etwa 9 kb großen p-vac Region lokalisierten *gvp*-Gene zugrunde. Die 14 *gvp*-Gene sind in zwei entgegengesetzt orientierten Genclustern, *p-gvpACNO* und *p-gvpDEFGHIJKLM*, angeordnet (Horne *et al.*, 1988; Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a). Die Promotoren der Gene *p-gvpD* und *p-gvpA* werden durch den Transkriptionsaktivator GvpE aktiviert (Gregor & Pfeifer, 2001 und 2005; Hofacker *et al.*, 2004). Es konnten bereits Sequenzbereiche ermittelt werden, die bei der GvpE-vermittelte Aktivierung der P_A - und P_D -Promotoren eine wichtige Rolle spielen (Gregor & Pfeifer, 2005; Bauer *et al.*, 2008). Für die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} konnte die Sequenz CATAACGA-n4-TGAAACCA und für die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} CGTTATGT-n4-TGTAATGA als wichtig identifiziert werden (Bauer *et al.*, 2008). Eine direkte Bindung des GvpE-Proteins an die DNA konnte bislang jedoch noch nicht gezeigt werden, auf welche Weise die Aktivierung erfolgt ist somit noch unklar. Da die Promotorregionen der Gasvesikelgene von *Hbt. salinarum* PHH4 (P_{cA}) und *Hfx. mediterranei* (P_{mcA} und P_{mCD}) ähnliche Sequenzmotive enthalten, wird vermutet, dass es sich um „upstream activator sequences“ (UAS) handelt, die von GvpE erkannt werden (Gregor & Pfeifer, 2005, Bauer *et al.*, 2008). Der Abstand der beiden je 8 nt langen Sub-E-UAS-Elemente von P_{pA} und P_{pD} zueinander und zum BRE des entsprechenden Promotors spielt eine wesentliche Rolle bei der GvpE-vermittelte Promotorinduzierung: Variationen dieser Abstände führen zu einem vollständigen Verlust der Aktivierbarkeit durch GvpE (Bauer *et al.*, 2008). Die Substitution der vollständigen GvpE-UAS des P_{mcA} -Promotors aus *Hfx. mediterranei* mit einer *nonsense* Sequenz resultiert in einem Verlust der Aktivierbarkeit dieses Promotors (Bauer *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit wurde die GvpE-vermittelte Aktivierung der Promotoren sowohl auf Promotorebene als auch auf Ebene des GvpE/TFB-Kontakts als möglicher Bestandteil des Transkriptionsapparats näher analysiert. Dafür wurden die an der Transkriptionsaktivierung beteiligten Sequenzen (GvpE-UAS) der Promotoren P_{pA} und P_{pD} näher untersucht und die Signifikanz der einzelnen Elemente der jeweiligen GvpE-UAS für die Aktivierung des entsprechenden Promotors bestimmt. Des Weiteren wurden in der P_{pD} -Promotorregion stromab der TATA-Box DNA-Abschnitte definiert, die neben den bekannten Motiven BRE und TATA-Box ebenfalls für die basale Transkriptionsinitiation von Bedeutung sind. Um den jeweiligen Anteil der GvpE-UAS (E-UAS), BRE und TATA-Box auf die Promotorstärke von P_{pA} und P_{pD} zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit Promotorchimären hergestellt bei denen die zu untersuchenden Motive gegenseitig ausgetauscht wurden. Durch Verwendung eines dualen Promotorkonstruktes konnte

sowohl die basale Aktivität als auch die GvpE-induzierte Aktivität des chimären P_{pA} - und des chimären P_{pD} -Promotors simultan studiert werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die GvpE/TFB-Interaktion näher analysiert und verschiedene cGvpE-Mutanten auf ihre Interaktionsfähigkeit mit dem basalen Transkriptionsfaktor TfbC hin getestet. Durch diese Analysen sollte der Interaktionsbereich in cGvpE genauer lokalisiert und ermittelt werden, ob der Verlust der Aktivatorfähigkeit bestimmter cGvpE-Mutanten durch eine mangelnde GvpE/TFB-Interaktion bedingt ist.

5.1 GvpE-UAS-Elemente haben unterschiedliche Signifikanz für P_{pA} und P_{pD}

Aufgrund des nur 35 nt langen Abstands zwischen dem BRE von P_{pA} (BRE_A) und dem BRE von P_{pD} (BRE_D) überlappen die beiden E-UAS im Zentrum der intergenen Region fast vollständig. Die simultane Untersuchung von P_{pA} und P_{pD} in einem dualen Promotorsystem zeigt, dass beide E-UAS zum selben Zeitpunkt aktiv sind. Mutationen im Zentrum der intergenen Region beeinträchtigen die GvpE-vermittelte Aktivierung beider Promotoren P_{pA} und P_{pD} am stärksten, was die Wichtigkeit des distal zum jeweiligen Promotor gelegenen 8 nt langen E-UAS-Elements für die Aktivierung zeigt (Bauer *et al.*, 2008). Dagegen zeigte die nähere Charakterisierung der E-UAS des P_{pA} -Promotors (E-UAS_A) in einem Einzelpromotorkonstrukt ohne P_{pD} , dass hier das distale Element für die Aktivierung dieses Promotors durch GvpE nicht notwendig ist (Bauer *et al.*, 2008). Für den P_{pA} -Promotor konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Substitution des proximalen E-UAS_A-Elements mit einer *nonsense* Sequenz zu einem vollständigen Verlust der GvpE-vermittelten Aktivierung dieses Promotors führt (Abb. 44 B). Da die BRE-Sequenzen der Promotoren P_{pA} und P_{pD} nur durch 35 nt voneinander separiert sind, lässt sich vermuten, dass sich beide Promotoren auf irgendeine Weise gegenseitig beeinflussen. Um einen möglichen Einfluss von P_{pA} und P_{pD} auf die Interaktion zwischen GvpE und der E-UAS des entsprechend gegenüberliegenden Promotors zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit - auf P_{pD} fokussiert - analog zu den Experimenten am P_{pA} -Einzelpromotorkonstrukt Substitutionsmutagenesen der P_{pD} -E-UAS (E-UAS_D) im P_{pD} -Einzel- und dualen Promotorkonstrukt aber auch der E-UAS_A in einem dualen Promotorkonstrukt durchgeführt.

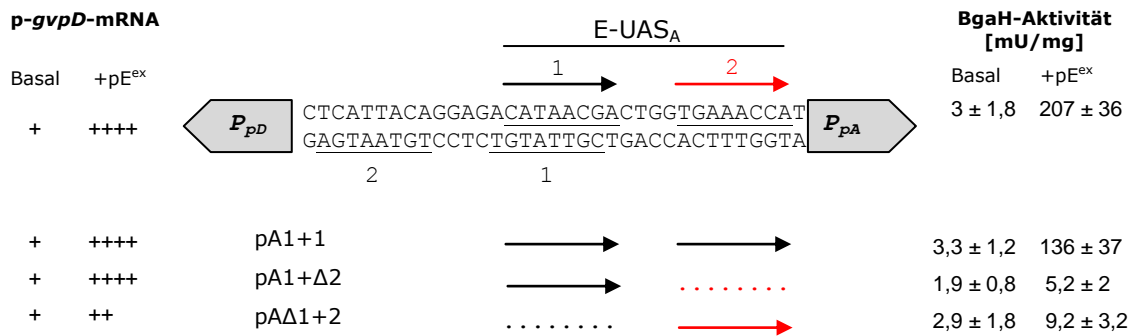
Zu Beginn wurde die Auswirkung von Modifikationen des proximalen oder des distalen **E-UAS_A**-Elements auf die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} in einem **dualen P_{pA} - P_{pD} -Promotorkonstrukt** analysiert. Hierfür wurde das entsprechende Element gezielt mutiert: In der E-UAS_A-Mutante pA1+1 wurde das proximale Element (Element 2) mit

der Sequenz des distalen (Element 1) substituiert, so dass die E-UAS_A aus zwei identischen Sequenzen bestand, in pA1+Δ2 und pAΔ1+2 wurde entsprechend das distale oder proximale Element mit einer *nonsense* Sequenz substituiert (Abb. 44 A). Mit Hilfe des *bgaH*-Reportersystems wurden die jeweiligen Promotoraktivitäten indirekt enzymatisch über die BgaH-Aktivität ermittelt. Um sicherzustellen, dass Unterschiede in den BgaH-Aktivitäten tatsächlich auf Veränderungen der Transkriptionsrate an P_{pA} zurückzuführen ist und nicht etwaige Translationsprobleme widerspiegeln, wurden mit der Gesamt-RNA der E-UAS_A-Mutanten Northern-Analysen durchgeführt. Eine mögliche Auswirkung der E-UAS_A-Mutationen auf die P_{pD} -Aktivität wurde im **dualen Konstrukt** mittels der p-*gvpD*-mRNA analysiert. Dies sollte ursprünglich über die Quantifizierung der mRNA mittels quantitativer *Real-Time* PCR (qRT-PCR) erfolgen. Bei der Auswertung zeigte sich jedoch, dass die Unterschiede in der P_{pD} -Promotoraktivität nicht signifikant genug für die Differenzierung über die gewählte qRT-PCR-Methode waren (siehe Abschnitt 4.1.3.2). Die p-*gvpD*-Transkriptmengen als Maß für die P_{pD} -Aktivität wurden mittels RNA-Dot-Blot semiquantitativ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 44 A nochmals zusammengefasst.

Die Menge der Transkripte bzw. BgaH-Aktivitäten der Promotoren P_{pA} und P_{pD} in den P_{pA} -E-UAS_{Mut}-Transformanten ohne pGvpE zeigte, dass die eingeführten Modifikationen die entsprechende Basalaktivität nicht beeinflussten. Somit resultierten eventuelle Veränderungen der Aktivität der GvpE-aktivierten Promotoren nicht aus einer bereits reduzierten Basalaktivität der mutierten Promotoren.

Der Einfluss der E-UAS_A-Mutationen auf die pGvpE-vermittelte Promotoraktivierung von P_{pA} und P_{pD} wurde in Transformanten bestimmt, die zusätzlich zu dem Promotorkonstrukt den p-*gvpE*-Leserahmen im haloarchaealen Expressionsvektor pJAS35 (pE^{ex}) enthielten. Alle drei E-UAS_A-Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte **GvpE-vermittelte P_{pA} -Aktivierung**. In der Transformante pA1+1+pE^{ex} zeigte der P_{pA} -Promotor im Vergleich zum Wildtyp nur 65% Aktivität. Die gleiche Mutation im P_{pA} -Einzelpromotorkonstrukt führte ebenfalls zu einer Reduktion der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} (Bauer *et al.*, 2008). Das distale E-UAS-Element (1) ist in zwei Orientierungen funktional (Bauer *et al.*, 2008). Die Verwendung dieses Elements in pA1+1 an distaler und proximaler Position wirkte sich etwas störend auf die GvpE-vermittelte P_{pA} -Aktivierung aus. Möglicherweise resultierte aus der Wechselwirkung mit einer E-UAS_A, die aus zwei 1er-Elementen besteht, eine ungünstigere GvpE-Aktivierungskonformation. Dies könnte damit zusammenhängen, dass GvpE die Fähigkeit besitzt an das Element 1 in zwei Orientierungen zu binden, und durch die Substitution des Elements 2 mit der DNA-Sequenz des Elements 1 das proximale E-UAS_A-Element in pA1+1 auch in der entgegengesetzten Orientierung funktional ist.

A



B

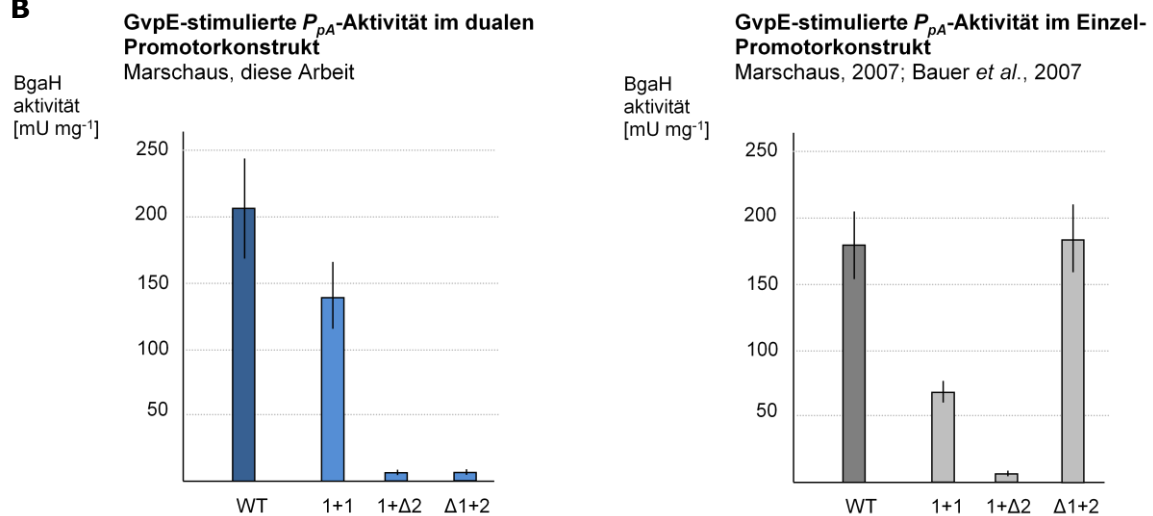


Abb. 44: (A) Doppelsträngige DNA-Sequenz der intergenen Region zwischen P_{pD} und P_{pA} und schematische Darstellung der 3 E-UAS_A-Mutanten und (B) Gegenüberstellung der spezifischen BgaH-Aktivitäten der E-UAS_A-Mutanten +pE^{ex} im dualen Promotorkonstrukt (links) und der im Rahmen meiner Diplomarbeit bereits ermittelten spezifischen Aktivitäten der E_A-UAS-Mutanten +pE^{ex} im Einzelpromotorkonstrukt (rechts). Die Promotoren P_{pD} und P_{pA} sind vereinfacht in Form von grauen Richtungspfeilen angegeben. Die Elemente beider E-UAS sind unterstrichen. Das distale E-UAS-Element ist mit 1, das proximale mit 2 gekennzeichnet. Die Elemente der E-UAS_A sind zusätzlich in Form von Pfeilen angegeben, wobei das proximale Element in rot dargestellt ist. Punkte stehen schematisch für die Substitution des entsprechenden Elements mit einer *nonsense* Sequenz. Rechts sind die in dieser Arbeit für den P_{pA} -Wildtyp und die jeweiligen Mutanten ermittelten spezifischen BgaH-Aktivitäten in Ab- (basal) bzw. Anwesenheit (+pE^{ex}) des Transkriptionsaktivators pGvpE angegeben. Links sind die jeweiligen relativen p-gvpD-Transkriptmengen in als Maß für die basale bzw. GvpE-induzierte (+pE^{ex}) P_{pD} -Aktivität immer in Bezug auf den Wildtyp in Form von + angegeben, wobei (+) die Basalaktivität darstellt; (+++++) gut aktivierbar wie WT; (++) schwächer aktivierbar.

In den Zelllysaten der pA1+Δ2+pE^{ex}- und pAΔ1+2+pE^{ex}-Transformanten wurden spezifische BgaH-Aktivitäten als Maß für die P_{pA} -Aktivität gemessen, die nur unwesentlich höher waren als die für diese Mutanten im dualen Promotorkonstrukt bestimmte P_{pA} -Basalaktivität. Auch die *bgaH*-Transkriptmengen waren in den P_{pA} -E-UAS_{Mut}+pE^{ex}-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp+pE^{ex} verringert. Dementsprechend lag der reduzierten BgaH-Aktivität in diesen Mutanten tatsächlich eine reduzierte Transkription an P_{pA} zugrunde. Deshalb konnte GvpE die Promotoraktivität nicht stimulieren. Aus

diesen Ergebnissen folgt, dass beide Sub-Elemente der E-UAS_A (entweder 1+2 oder 1+1) für eine GvpE-vermittelte P_{pA} -Aktivierung notwendig sind.

Neben der P_{pA} -Aktivität wurde auch die GvpE-induzierte Aktivität von P_{pD} in diesem **dualen Promotorkonstrukt** gemessen. In dem RNA-Dot-Blot zur Ermittlung der pGvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} war nur in der pAΔ1+2+pE^{ex}-Transformante die p-*gvpD*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp etwa 4fach reduziert. Bereits die *scanning* Mutagenese der intergenen Region zwischen P_{pD} und P_{pA} zeigte die Wichtigkeit des Zentrums der intergenen Region für die GvpE-vermittelte Aktivierung beider Promotoren P_{pD} und P_{pA} (Bauer *et al.*, 2008). In der Wildtyp+pE^{ex}-Transformante und den Transformanten pA1+1+pE^{ex} und pA1+Δ2+pE^{ex} wurden die p-*gvpD*-mRNAs in annähernd gleicher Menge detektiert. Dieses Ergebnis wird auch von der *scanning* Mutagenese der intergenen Region unterstützt, wo gezeigt wurde, dass Mutationen stromauf des jeweiligen E-UAS-Elements 1 keinen Einfluss auf die GvpE-vermittelte Aktivierung des entsprechenden Promotors haben (Bauer *et al.*, 2008). Mutationen im proximalen E-UAS-Element (2) von P_{pA} beeinflussten also die GvpE-induzierte Aktivität von P_{pD} nicht, die Substitution des distalen E-UAS_A-Elements (1), welches auch als distales E-UAS_D-Element (1) für P_{pD} fungiert, reduzierte jedoch die GvpE-stimulierte Aktivität von P_{pD} .

Vergleicht man die für den P_{pA} -Promotor ermittelten Ergebnisse der Substitutionsmutagenese am dualen und P_{pA} -Einzelpromotorkonstrukt so zeigt sich, dass in beiden Konstrukten die Substitution des proximalen E-UAS_A-Elements mit einer *nonsense* Sequenz (pA1+Δ2) zum Verlust der GvpE-Aktivierbarkeit führte (Abb.44 B). Die Positionierung der Sequenz des distalen Elements an Position 2 in pA1+1 führt in beiden Konstrukten zwar zu einer schwächeren aber dennoch signifikanten GvpE-vermittelten P_{pA} -Aktivierung (Abb. 44 B). Dass für diese beiden Mutanten mit beiden Konstrukten das gleiche Ergebnis erzielt wurde zeigt, dass es für die Funktion des proximalen E-UAS_A-Elements unerheblich ist, ob die funktionale P_{pD} -Promotorregion vorhanden ist oder nicht. Für eine erfolgreiche Aktivierung des P_{pA} -Promotors muss ein E-UAS_A-Sub-Element in räumlicher Nähe zu BRE_A vorhanden sein. Hierbei kann es sich entweder um die DNA-Sequenz des Elements 1 oder 2 handeln. Die Daten lassen daher für GvpE eine Rolle bei der Rekrutierung von Proteinen des basalen Transkriptionsapparates vermuten. Die fehlende Aktivierbarkeit von P_{pA} in der Mutante pAΔ1+2 im dualen Promotorkonstrukt steht im Widerspruch zu der Analyse der GvpE-vermittelten Aktivierbarkeit des P_{pA} -Promotors in der entsprechenden Einzelpromotormutante (Abb. 44 B), bestätigt aber die bereits in einem dualen P_{pA} - P_{pD} -Promotorkonstrukt ermittelte Notwendigkeit des Zentrums der intergenen Region für die P_{pA} -Aktivierung durch GvpE bei Anwesenheit der P_{pD} -Promotorregion (Bauer *et al.*, 2008). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Funktionalität des distalen Elements im Einzel- und dualen Promotorkonstrukt könnte im Aufbau der Konstrukte begründet sein.

Im dualen Promotorkonstrukt ist im Gegensatz zum Einzelpromotorkonstrukt die gesamte P_{pD} -Promotorregion plus p-*gvpD*-Leserahmen enthalten, welche augenscheinlich die Wechselwirkung zwischen GvpE und E-UAS_A zur Aktivierung von P_{pA} im dualen Promotorkonstrukt beeinflusst.

Eine weitere Spekulation wäre, dass für eine effiziente GvpE-induzierte Transkriptionserhöhung an beiden Promotoren P_{pA} und P_{pD} eine Wechselwirkung zwischen den mit den distalen Elementen der beiden E-UAS und den entsprechenden Promotoren interagierenden GvpE-Proteinen benötigt wird. Da in *Hbt. salinarum* p-*gvpD* und p-*gvpE* ausgehen von P_{pD} co-transkribiert werden, wird zeitgleich der Transkriptionsaktivator (GvpE) und der Repressor der Gasvesikelbildung (GvpD) synthetisiert. Eine Wechselwirkung der GvpE-Proteine untereinander könnte gewährleisten, dass P_{pA} in Anwesenheit von P_{pD} nur aktiviert werden kann, wenn zeitgleich P_{pD} aktiviert und somit neben GvpE auch der Repressor GvpD produziert wird. Durch dieses regulatorische Netzwerk könnte eine Überproduktion des GvpA-Proteins verhindert werden.

Da für die beiden Elemente der E-UAS_A bereits eine unterschiedliche Signifikanz für die GvpE-vermittelte P_{pA} -Aktivierung ermittelt werden konnte, wurde auch die Funktion der beiden **E-UAS_D**-Elemente für die Induktion von **P_{pD}** durch GvpE analysiert. Zum funktionellen Vergleich der beiden E-UAS_D-Elemente ohne und mit dem gegenläufig orientierten Promotor P_{pA} erfolgte die jeweilige Modifikation der E-UAS_D ebenfalls in einem P_{pD} -Einzel- und einem dualen P_{pD} - P_{pA} -Promotorkonstrukt, wobei in diesem Fall P_{pD} mit *bgaH* als Reporter fusioniert wurde.

In beiden Konstrukten wurde entweder Element 1 oder 2 der E-UAS_D mit einer *nonsense* Sequenz (pD1+Δ2, pDΔ1+2) bzw. Element 2 mit der DNA-Sequenz des distalen Elements 1 (pD1+1) substituiert (Abb. 45 A, B). Im P_{pD} -Einzelpromotorkonstrukt wurde weiterhin Element 1 mit der DNA-Sequenz des proximalen Elements 2 (pD2+2) substituiert (Abb. 45 A). Für die quantitative Analyse der P_{pD} -Aktivität der E-UAS_D-Mutanten wurde der *bgaH*-Leserahmen als Reportergen verwendet. Die Aktivität von P_{pA} im dualen Promotorkonstrukt wurde dagegen mit dem p-*gvpA*-Leserahmen mittels RNA-Dot-Blot untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 45 zusammengefasst.

Die ermittelten P_{pD} -Basalaktivitäten der Mutanten pD1+1, pD2+2 und pDΔ1+2 im **Einzelpromotorkonstrukt** lagen jeweils in der Größenordnung der Basalaktivität des P_{pD} -Wildtyps. Die Transformante pD1+Δ2+pJAS zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöhte spezifische BgaH-Aktivität, die aber noch im Normbereich lag. Die *bgaH*-mRNA wurde von den E-UAS_D-Mutanten ebenfalls in zum Wildtyp vergleichbaren Mengen gebildet. Somit hatten diese in die E-UAS_D eingeführten Mutationen keinen Effekt auf die basale Aktivität des P_{pD} -Promotors. Die im **dualen Promotorkonstrukt** ermittelte basale P_{pD} -Aktivität von pD1+1, pD1+Δ2 und pD1+Δ2 entsprach ebenfalls der im dualen

Promotorkonstrukt ermittelten Basalaktivität des P_{pD} -Wildtyps. Die mittels RNA-Dot-Blot ermittelten basalen P_{pA} -Aktivitäten der E-UAS_D-Mutanten im dualen Promotorkonstrukt lagen alle in der Größenordnung des P_{pA} -Wildtyps. Demnach erfolgte durch die eingeführten Mutationen keine Beeinflussung der Basalaktivität von P_{pD} und P_{pA} . Dies wurde erwartet, da alle in die E-UAS_D eingeführten Mutationen nicht die für die Transkriptionsinitiation wichtigen Motive BRE und TATA-Box betreffen.

In Anwesenheit des Transkriptionsaktivators pGvpE wurde die spezifische BgaH-Aktivität des P_{pD} -Wildtyppromotors im **Einzelpromotorkonstrukt** rund 23fach erhöht (Abb. 45 A). Eine ähnlich hohe Stimulierung der P_{pD} -Aktivität durch pGvpE zeigte im Einzelpromotorkonstrukt nur die Mutante pD2+2 (Abb. 45 A). Die Verwendung der Sequenz des proximalen Elements 2 an beiden Positionen in der E-UAS_A führt im P_{pA} -Promotorkonstrukt ebenfalls nur zu einer leicht reduzierten GvpE-aktivierten P_{pA} -Aktivität (Bauer *et al.*, 2008). Demnach scheint eine E-UAS_D die aus zwei identischen proximalen Elementen besteht voll funktionsfähig zu sein. Die Interaktion von GvpE mit dem Zentrum der intergenen Region ist demnach nicht zwangsläufig an die Sequenz des jeweils distalen E-UAS-Elements (1) gebunden.

Für die Mutanten pD1+1+pE^{ex}, pD1+Δ2+pE^{ex} und pDΔ1+2+pE^{ex} wurden im Einzelpromotorkonstrukt spezifische BgaH-Aktivitäten ermittelt, die der P_{pD} -Basalaktivität entsprachen (Abb. 45 A). Demnach ist P_{pD} in diesen Mutanten nicht mehr durch GvpE aktivierbar. Dieses Ergebnis wurde auch bei Analyse der *bgaH*-Transkriptmengen bestätigt. Im **dualen Promotorkonstrukt** zeigten alle drei E-UAS_D-Mutanten pD1+1+pE^{ex}, pD1+Δ2+pE^{ex} und pDΔ1+2+pE^{ex} wie schon im Einzelpromotorkonstrukt eine im Vergleich zum P_{pD} -Wildtyp stark reduzierte GvpE-vermittelte P_{pD} -Aktivierung (Abb. 45 B).

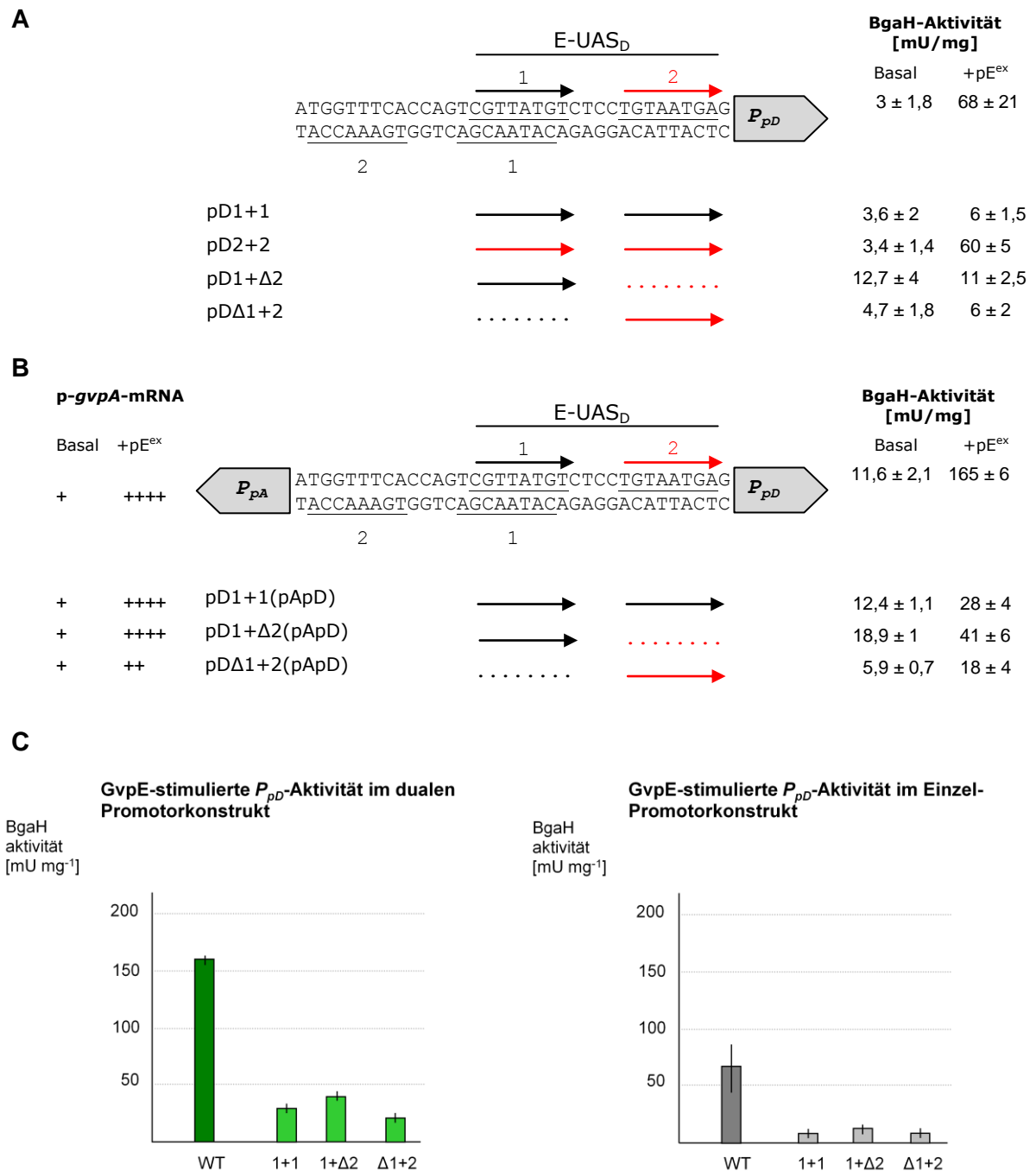


Abb. 45: Doppelsträngige DNA-Sequenz der intergenen Region zwischen P_{pD} und P_{pA} und schematische Darstellung der E-UAS_D-Mutanten im Einzel- (A) bzw. dualen Promotorkonstrukt (B) und (C) Gegenüberstellung der spezifischen BgaH-Aktivitäten der E-UAS_D-Mutanten +pE^{ex} in beiden Konstrukten. Die Promotoren P_{pD} und P_{pA} sind vereinfacht in Form von grauen Richtungspfeilen angegeben. Die Elemente beider E-UAS sind unterstrichen. Das distale E-UAS-Element ist mit 1, das proximale mit 2 gekennzeichnet. Die Elemente der E-UAS_D sind zusätzlich in Form von Pfeilen angegeben, wobei das proximale Element in rot dargestellt ist. Punkte stehen schematisch für die Substitution des entsprechenden Elements mit einer *nonsense* Sequenz. Rechts sind die für den P_{pD} -Wildtyp und die jeweiligen Mutanten ermittelten spezifischen BgaH-Aktivitäten in Ab- (basal) bzw. Anwesenheit (+pE^{ex}) des Transkriptionsaktivators pGvpE angegeben. In (B) sind zusätzlich links die jeweiligen relativen p-gvpA-Transkriptmengen in als Maß für die basale bzw. GvpE-induzierte (+pE^{ex}) P_{pA} -Aktivität immer in Bezug auf den Wildtyp in Form von + angegeben, wobei (+) die Basalaktivität darstellt; (+++++) gut aktivierbar wie WT; (++) schwächer aktivierbar.

Die mittels RNA-Dot-Blot-Analysen semiquantitativ anhand der gebildeten p-*gvpA*-Transkriptmengen ermittelten pGvpE-induzierten **P_{pA}** -Aktivitäten von pD1+1 und pD1+Δ2 im **dualen Promotorkonstrukt** waren vergleichbar zum P_{pA} -Wildtyp (Abb. 45 B). In der Transformante pDΔ1+2 war allerdings die Menge der p-*gvpA*-mRNA im Vergleich zum P_{pA} -Wildtyp etwa 4fach geringer (Abb. 45 B). Dieses Ergebnis stimmt gut mit früheren Untersuchungen überein, die bereits die Wichtigkeit des Zentrums der intergenen Region für die Aktivierbarkeit beider Promotoren P_{pD} und P_{pA} durch GvpE zeigten (Bauer *et al.*, 2008).

Der Verlust der Aktivierbarkeit von P_{pD} in pD1+1 im Einzel- und dualen Promotorkonstrukt zeigte klar, dass sich die Verwendung der DNA-Sequenz des distalen E-UAS_D-Elements an Position 2 der E-UAS_D störend auf die Aktivierung von P_{pD} ausübte. Die Mutation pA1+1 in der E-UAS_A zeigte bereits einen ähnlichen Effekt (Bauer *et al.*, 2008; diese Arbeit). Im Gegensatz zu pD1+1 führte die Mutation in pA1+1 jedoch nur zu einer Reduktion der Aktivierbarkeit von P_{pA} (Bauer *et al.*, 2008; diese Arbeit). Die Interaktion zwischen GvpE und einer E-UAS_D die zweimal die DNA-Sequenz des E-UAS_D-Elements 1 trägt, scheint demnach die Aktivierungs-Konformation von pGvpE stärker zu beeinflussen und die Aktivatorfunktion vollständig zu inhibieren. Die starke Reduktion bzw. der Verlust der Aktivierbarkeit von P_{pD} in pD1+Δ2 im dualen bzw. Einzelpromotorkonstrukt bestätigte die Notwendigkeit des proximalen E-UAS_D-Elements für die GvpE-vermittelte Aktivierung. Eins der beiden E-UAS-Elemente (hier Element 2) muss für eine effiziente Promotoraktivierung neben dem BRE vorhanden sein.

Auch die Substitution der distalen E-UAS_D-Sequenz 1 in pDΔ1+2 führte zu keiner (Einzelpromotorkonstrukt) oder einer stark erniedrigten GvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivierbarkeit (duals Promotorkonstrukt). Beim P_{pA} -Promotor war die Sequenz 1 der E-UAS_A auch im dualen Promotorkonstrukt wichtig. Der Verlust des distalen E-UAS-Elements führte also in den drei hier aufgelisteten Fällen (P_{pD} -Einzelpromotorkonstrukt, beide dualen Promotorkonstrukte) zum Verlust der pGvpE-vermittelten Aktivierbarkeit von P_{pD} bzw. P_{pA} . Dies zeigt erneut die Wichtigkeit des distalen Elements für die GvpE-vermittelte Aktivierung beider Promotoren.

Generell hatten die in die **E-UAS_D** eingeführten Mutationen im Einzel- und im dualen Promotorkonstrukt einen ähnlichen Effekt auf die GvpE-vermittelte **P_{pD}** -Aktivierung: Die Verwendung der DNA-Sequenz des distale Elements an Position 1 und 2 führte gleichermaßen wie die Substitution des proximalen bzw. distalen E-UAS_D-Elements mit einer *nonsense* Sequenz zu einem Verlust bzw. einer Reduktion der GvpE-vermittelten Promotoraktivierung (Abb. 45 C). Auffällig war jedoch, dass durch die Mutationen 1+1 und 1+Δ2 die Aktivierbarkeit von P_{pD} im dualen Promotorkonstrukt im Gegensatz zum Einzelpromotorkonstrukt nur stark reduziert wurde. In Bezug auf die P_{pD} -Basalaktivität

dieser Mutanten erfolgte eine Verdopplung der Aktivität von P_{pD} in Anwesenheit von pGvpE. Hingegen konnten die P_{pD} -Aktivitäten der gleichen Mutanten im P_{pD} -Einzelpromotorkonstrukt nicht mehr durch pGvpE stimuliert werden. Daher ist anzunehmen, dass die Substitution des proximalen E-UAS_D-Elements mit der DNA-Sequenz des Elements 1 oder mit einer *nonsense* Sequenz in einer nichtfunktionalen E-UAS_D resultierte. Der pGvpE-vermittelten P_{pD} -Stimulierung im dualen Promotorkonstrukt könnte eventuell keine direkte Interaktion zwischen GvpE und E-UAS_D zugrunde gelegen haben: Da die E-UAS_A von den Mutationen pD1+1 und pD1+Δ2 nicht betroffen ist, erfolgte in diesen Mutanten eine dem Wildtyp entsprechende GvpE-vermittelte P_{pA} -Aktivierung. Eine mögliche Spekulation wäre, dass eine Wechselwirkung zwischen GvpE und E-UAS_A möglicherweise ausreichend ist, um weitere GvpE-Proteine an die P_{pD} - P_{pA} -Region zu rekrutieren. Dies könnte zur Folge haben, dass diese GvpE-Proteine trotz nichtfunktionaler E-UAS_D die Transkription von P_{pD} leicht stimulieren. Da in diesem Fall die P_{pD} -Aktivierung durch GvpE nicht unmittelbar durch Wechselwirkung mit der E-UAS_D erfolgen würde sondern mittelbar über Interaktion zwischen den GvpE-Proteinen, ist es denkbar, dass die Stimulierung im Vergleich zur Stimulierung des Wildtyps reduziert sein könnte. Im Gegensatz dazu konnte der P_{pA} -Promotor in pA1+Δ2+pE^{ex} nicht durch pGvpE stimuliert werden (Abb. 44). Dies könnte für eine schwächere Bindungsaffinität des GvpE-Proteins zur E-UAS_D als zur E-UAS_A sprechen. Vielleicht ist die Bindungsaffinität zu schwach, um eine durch GvpE-E-UAS_D-Interaktion induzierte Rekrutierung von GvpE zu P_{pA} zu erlauben. In weiteren Versuchen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen GvpE und E-UAS_A zu einer stärkeren Promotoraktivierung führte als die Wechselwirkung mit E-UAS_D (siehe Abschnitt 5.3), was die Theorie der stärkeren Bindungsaffinität von GvpE zur E-UAS_A erhärtet.

Zusammenfassend ließ sich in diesem Teil der Arbeit zeigen, dass die beiden E-UAS der Promotoren P_{pD} und P_{pA} in ihrer Funktion nicht identisch sind. In der nativen P_{pD} - P_{pA} -Konformation ist die distale E-UAS_A-Sequenz 1 für eine effiziente GvpE-vermittelte P_{pA} -Aktivierung zwingend erforderlich. Dagegen spielt es bei der GvpE-vermittelten Aktivierung von P_{pA} ohne funktionale P_{pD} -Promotorregion keine Rolle (Bauer *et al.*, 2008). Das distale E-UAS_D-Element 1 ist sowohl in An- als auch in Abwesenheit von P_{pA} für die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} notwendig. Die proximalen E-UAS-Elemente 2 besitzen ebenfalls eine unterschiedliche Bedeutung für die Aktivierung des entsprechenden Promotors: Die Aktivierung von P_{pD} konnte nur erfolgen, wenn das proximale E-UAS_D-Element 2 in direkter Nachbarschaft zum BRE_D lokalisiert war. Dagegen konnte eine Aktivierung von P_{pA} erfolgen, wenn sowohl die DNA-Sequenz des proximalen (Element 2) als auch die des distalen E-UAS_A-Elements 1 (Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp reduziert) in räumlicher Nähe zum BRE_A lokalisiert war. Wie schon in Bauer *et al.* (2008) gezeigt, kann keine Aktivierung des entsprechenden Promotors

durch GvpE erfolgen, wenn das proximale E-UAS-Element 2 mit einer *nonsense* Sequenz substituiert wurde. Das proximale E-UAS_D-Element alleine ist aber anders als das proximale E-UAS_A-Element im P_{pA} -Einzelpromotorkonstrukt (Bauer *et al.*, 2008) nicht für eine GvpE-vermittelte P_{pD} -Aktivierung ausreichend. Zum besseren Verständnis der Rolle der DNA-Sequenzen der proximalen E-UAS-Elemente für die GvpE-vermittelte Promotoraktivierung wäre es aufschlussreich, in den dualen Promotorkonstrukten die proximale E-UAS_D- und E-UAS_A-Elemente gegeneinander auszutauschen oder gegen eine *nonsense* Sequenz zu substituieren. Auf jeden Fall zeigten die Daten klar, dass ein proximales, in direkter Nähe zum entsprechenden BRE lokalisiertes Element für die Funktionalität beider E-UAS essentiell ist.

5.2 Der Bereich stromab der TATA-Box ist wichtig für die basale und GvpE-induzierte P_{pD} -Aktivität

Neben BRE und TATA-Box ist für den P_{pA} -Promotor ein weiterer DNA-Bereich für die Promotoraktivität von Bedeutung. Die Region um -10 relativ zum Transkriptionsstart ist sowohl für die Initiation der basalen als auch für die GvpE-vermittelte Aktivität von P_{pA} wichtig, da Mutationen in diesem Bereich zu einem Verlust der Basalaktivität und einer Reduktion der GvpE-stimulierten P_{pA} -Aktivität führen (Hofacker *et al.*, 2004). In einer genomweiten, bioinformatischen Studie wurde neben der TATA-Box und dem BRE ein neues an Position -10 und -11 (relativ zum experimentell bestimmten Transkriptionsstart) lokalisiertes Element mit dem Motiv WW (W = A oder T) ermittelt (Brenneis *et al.*, 2007). Der konservierte Abstand zu TATA-Box, BRE und Transkriptionsstart weist darauf hin, dass es sich bei diesem Element um ein *bona fide* Promotorelement handelt (Brenneis *et al.*, 2007).

In den DNA-Sequenzen der Promotorregionen der *gvp*-Promotoren P_{pA} und P_{pD} sind an Position -10 und -11 ebenfalls WW-Motive mit der Sequenz TA (P_{pA}) bzw. AA (P_{pD}) lokalisiert. Das für P_{pA} bereits ein Einfluss dieser Sequenz auf die Promotoraktivität gezeigt werden konnte (Hofacker *et al.*, 2004) warf die Frage auf, ob bzw. wie die Region stromauf des p-*gvpD*-Transkriptionsstarts zur Stärke des P_{pD} -Promotors beiträgt. Um neben den bekannten basalen Promotorelementen BRE und TATA-Box weitere Sequenzmotive zu ermitteln, die für die basale Transkriptionsinitiation von P_{pD} bedeutsam sind, wurde eine *scanning* Mutagenese der P_{pD} -Promotorregion durchgeführt, wobei gezielt Nukleotide in einem Raster von 4 Nukleotiden in der Region von -1 bis -50 relativ zum Transkriptionsstart (TS) substituiert wurden. Für die Aktivierung von P_{pD} ist mindestens die 20 nt lange E-UAS_D in der intergenen Region zwischen P_{pD} und P_{pA} notwendig (Bauer *et al.*, 2008). Um eine mögliche Beteiligung der Region stromab von TATA_D auf die Promotoraktivierung durch GvpE zu ermitteln, wurden die P_{pD} -Aktivitäten

beeinflusst (Hofacker *et al.*, 2004). Die stark reduzierte Basalaktivität in M9 bis M11 könnte auf ein weiteres wichtiges Promotorelement in diesem Bereich hindeuten. Da die Basalaktivität in M8 und M12 nicht beeinträchtigt war, lässt sich dieses putative Promotorelement auf den Bereich -4 bis -11 relativ zum TS eingrenzen. Für die Position -10 bis -11 relativ zum experimentell ermittelten TS wurde bereits in einer zur Charakterisierung basaler haloarchaealer Promotorelemente durchgeführten bioinformatischen Studie ein *bona fide* Promotorelement ermittelt (Brenneis *et al.*, 2007). In der Promotorregion des *araS*-Gens aus *Sulfolobus solfataricus* wurde im Bereich von -7 bis -12 relativ zum TS ebenfalls ein proximales Promotorelement beschrieben, welches für die Aktivität von P_{araS} wichtig ist (Peng *et al.*, 2009). Möglicherweise geht TFB als DNA-bindendes Protein eine Interaktion mit diesem putativen Promotorelement ein. In *Pyrococcus furiosus* konnte bereits gezeigt werden, dass TFB an mehreren Positionen - so auch im Bereich von +1 bis -10 relativ zum TS - mit der Promotorregion interagiert (Renfrow *et al.*, 2004).

Bei Analyse der **pGvpE**-stimulierten **P_{pD}** -Aktivität zeigten von den 12 Mutanten der 4 bp *scanning* Mutagenese 11 Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte spezifische BgaH-Aktivität. Nur in der Mutante M8 konnte eine im Vergleich zum P_{pD} -Wildtyp stärkere Stimulierung des Promotors durch GvpE erfolgen. Die unterschiedlichen spezifischen BgaH-Aktivitäten der verschiedenen Transformanten korrelierten mit denen im Northern-Blot ermittelten *bgaH*-Transkriptmengen. Demnach hatten die eingeführten Mutationen einen direkten Effekt auf die Transkription an P_{pD} . Die in M1 bis M4 mutierten DNA-Sequenzen sind alle stromauf des BRE_D in der GvpE-UAS des P_{pD} -Promotors lokalisiert. Die in M2 bis M4 eingeführten Mutationen betrafen das proximale E-UAS_D-Element. Eine Beeinträchtigung der P_{pD} -Aktivierung durch GvpE in den Mutanten M2 bis M4 war daher zu erwarten - eine Beteiligung dieses Elements an der Aktivierung konnte bereits gezeigt werden (Bauer *et al.*, 2008; diese Arbeit). Dass in M1 die Promotorstimulierung ebenfalls betroffen war, war überraschend. In dieser Mutante wurden die vier Nukleotide substituiert, welche das proximale vom distalen E-UAS_D-Element trennen. Bislang wurde angenommen, dass diese vier Nukleotide für die GvpE-vermittelte P_{pD} -Promotoraktivierung nicht wichtig sind, da eine Substitution dieses Bereichs zwischen Element 1 und 2 der E-UAS_D nur in einer geringfügigen Reduktion der GvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivität resultierte (Bauer *et al.*, 2008). Jedoch führt die Deletion von drei dieser vier Nukleotide zu einem vollständigen Verlust der Aktivierbarkeit von P_{pD} durch GvpE (Bauer *et al.*, 2008). Bei Vergleich der entsprechenden Sequenzen der P_{pD} - und P_{mCD} -GvpE-UAS fällt auf, dass zwischen diesen vier Nukleotiden eine Sequenzähnlichkeit vorhanden ist (Abb. 47).

	1	2	BRE	TATA
pD	ATGGTTTCACCACT	<u>CGTTATGTCTC</u>	<u>CTGTAATGAG</u>	<i>TCGTACTTCTAAG</i>
mcD	GTTGGTTCTGCAAC	<u>CGTTTCACCTC</u>	<u>CTGTAATGAG</u>	<i>TCAAACATCTAAG</i>

Abb. 47: Vergleich der GvpE-UAS_D der p-vac- und mc-vac-Region. Die BRE (kursiv) und TATA-Boxen der Promotoren P_{pD} und P_{mcD} sind hellgrau hinterlegt. Das distale E-UAS-Element ist mit 1, das proximale mit 2 gekennzeichnet. Zwischen den vac-Regionen konservierte Nukleotide sind fett hervorgehoben (nach Bauer *et al.*, 2008). Die in der P_{pD} - und P_{mcD} -Promotorregion zwischen Element 1 und 2 lokalisierten identischen Nukleotide sind dunkelgrau hinterlegt.

Man kann daher mutmaßen, dass die DNA-Sequenz zwischen dem distalen und proximalen E-UAS_D-Element - anders als bisher vermutete - ebenfalls für die Promotoraktivierung wichtig ist. Dass die Mutationen M1 bis M4 nicht wie in pD1+1 und pD1+Δ2 (siehe Abschnitt 5.1) zu einem vollständigen Verlust der GvpE-vermittelten P_{pD} -Aktivierbarkeit führten, ist wahrscheinlich in der Größe des jeweiligen mutierten DNA-Sequenzabschnittes begründet. In pD1+1 und pD1+Δ2 ist jeweils das gesamte proximale E-UAS_D-Element substituiert. Dagegen wurde hier die P_{pD} -Promotorregion in einem Vierer-Raster mutiert, und ein Teil der nativen Sequenz des proximalen Elements blieb somit vorhanden. Dieser Teilbereich schien ausreichend zu sein, um eine - obgleich reduzierte - Promotoraktivierung durch GvpE zu gewährleisten.

In den Mutanten M5, M6 und M9 bis M11 konnte trotz reduzierter Basalaktivität eine Stimulierung von P_{pD} in Anwesenheit von pGvpE erfolgen. Die Faktoren der Induzierung lagen dabei mit Ausnahme von M9 in der Größenordnung des für den P_{pD} -Wildtyp ermittelten Faktors. Wobei generell beachtet werden muss, dass dieser Faktor nur ein grober Hinweis für die Stärke der GvpE-vermittelten Promotoraktivierung sein kann, da er stabile Werte sowohl für die basale als auch für die induzierte Promotoraktivität voraussetzt. In M9 z.B. übersteigt die Standardabweichung ($\pm 1,1$) den gemittelten Wert (0,9 mU/mg) der spezifischen BgaH-Aktivität welcher als Maß für die P_{pD} -Basalaktivität ermittelt wurde. Für den pGvpE-aktivierten P_{pD} -Promotor der Mutante M9 wurde eine spezifische BgaH-Aktivität von 17 ± 8 mU/mg ermittelt. Demnach fällt der Faktor der Induktion mit 19 aufgrund der hohen Standardabweichungen im Vergleich zum Wildtyp (Faktor 43) relativ gering aus. Die basale und GvpE-stimulierte Promotoraktivität in M10 liegt mit $0,3 \pm 0,1$ mU/mg bzw. 14 ± 3 mU/mg im Bereich der entsprechenden Aktivitäten in M9. Dagegen ist der Faktor der GvpE-Induktion in M10 mit 47 deutlich höher als der für M9 ermittelte, was auf gleichmäßigere Werte der spezifischen BgaH-Aktivität zurückzuführen ist. Da in M5, M6 und M9 bis M11 eine Stimulierung des P_{pD} -Promotors durch pGvpE erfolgen konnte, sind vermutlich die hier mutierten DNA-Sequenzen für die GvpE-vermittelte Promotoraktivierung nicht wichtig. Vielmehr könnten

die in diesen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp reduzierten spezifischen BgaH-Aktivitäten durch die schwachen Basalaktivitäten erklärt werden. Eine Beeinträchtigung der Basalaktivität scheint demnach nicht vollständig durch den Transkriptionsaktivator GvpE „kompensiert“ zu werden. Der P_{pD} -Promotor in M7 konnte dagegen nicht durch GvpE stimuliert werden. Bereits die basale Promotoraktivität war in dieser Mutante sehr gering. Wie bereits vorangehend beschrieben ist die in M7 mutierte DNA-Region in einem Bereich lokalisiert, der vermutlich während der basalen Transkriptionsinitiation durch den TBP/TFB-Komplex bedeckt ist. Eventuell verändert die eingeführte Mutation die räumliche Struktur der DNA so, dass die Bindung von TBP bzw. TFB an die DNA fast vollständig behindert wird und die Initiation der Transkription durch GvpE nicht mehr aktiviert werden kann. Um zu ermitteln, ob der stark reduzierte Promotoraktivität tatsächlich solch ein Effekt zugrunde lag, sollte die Substitution dieses DNA-Bereichs mit DNA-Sequenzen wiederholt werden, deren Basenabfolgen sich von der hier verwendeten unterscheiden. Auffällig war die im Vergleich zum Wildtyp über 50 % erhöhte GvpE-vermittelte Promotoraktivität in M8. Dies könnte dafür sprechen, dass der DNA-Abschnitt im Bereich von -12 bis -15 für die GvpE-vermittelte P_{pD} -Aktivierung von Bedeutung ist. Möglicherweise erfolgt eine Wechselwirkung zwischen GvpE und diesem DNA-Abschnitt und die in M8 verwandte Basenabfolge könnte eine Erhöhung der Effizienz dieser Wechselwirkung zur Folge gehabt haben. Auch hier sollte das Ergebnis mit variablen Substitutionen in diesem DNA-Sequenzabschnitt überprüft werden.

Die im Vergleich zum Wildtyp auf 2/3 reduzierte spezifische BgaH-Aktivität in der Transformante M12+pE^{ex} ist durch die Lokalisation des mutierten DNA-Abschnitts begründet, da hier die direkt stromauf an den TS angrenzenden Nukleotide mutiert wurden, was sich manchmal störend auf die Transkriptionseffizienz auswirkt. Vergleicht man die Ergebnisse der *scanning* Mutagenesen der P_{pA} - (Hofacker *et al.*, 2004) und P_{pD} -Promotorregion (diese Arbeit) so fällt auf, dass die Region ab der TATA-Box bis zum TS einen stärkeren Einfluss auf die Aktivität von P_{pD} besitzt als auf P_{pA} (Abb. 48). Die in die P_{pD} -Promotorregion eingeführten Mutationen resultierten mit Ausnahme von M8 in einer sehr starken Reduktion der GvpE-induzierten P_{pD} -Aktivität. Dagegen beeinflussen die in die P_{pA} -Promotorregion eingeführten Mutationen die GvpE-induzierte P_{pA} -Aktivität verhältnismäßig wenig. Mutationen der DNA-Sequenz an die der TBP/TFB-Komplex bindet, führen in der P_{pA} -Region nur zu einer leicht reduzierten bzw. unbeeinflussten GvpE-vermittelten P_{pA} -Aktivierung. Dagegen resultierten diese Mutationen in der P_{pD} -Region sehr häufig in einer starken Reduktion bzw. einem Verlust der GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} . Diese Daten implizieren, dass die Aktivierung von P_{pD} durch GvpE stärker von einer funktionalen TBP-TFB-DNA-Interaktion abhängig ist als die Aktivierung von P_{pA} . Des Weiteren scheint in den Regionen stromauf der TS ein weiteres regulatorisches Element lokalisiert zu sein, welches die P_{pD} -Aktivität beeinflusst. Um diese

DNA-Region mit ihren regulatorischen Eigenschaften zu definieren und dessen Funktion näher zu charakterisieren, sollten ähnliche *scanning* Mutagenesen an den durch GvpE aktivierbaren Promotoren P_A und P_D der mc-vac- und c-vac-Region vergleichend durchgeführt werden.

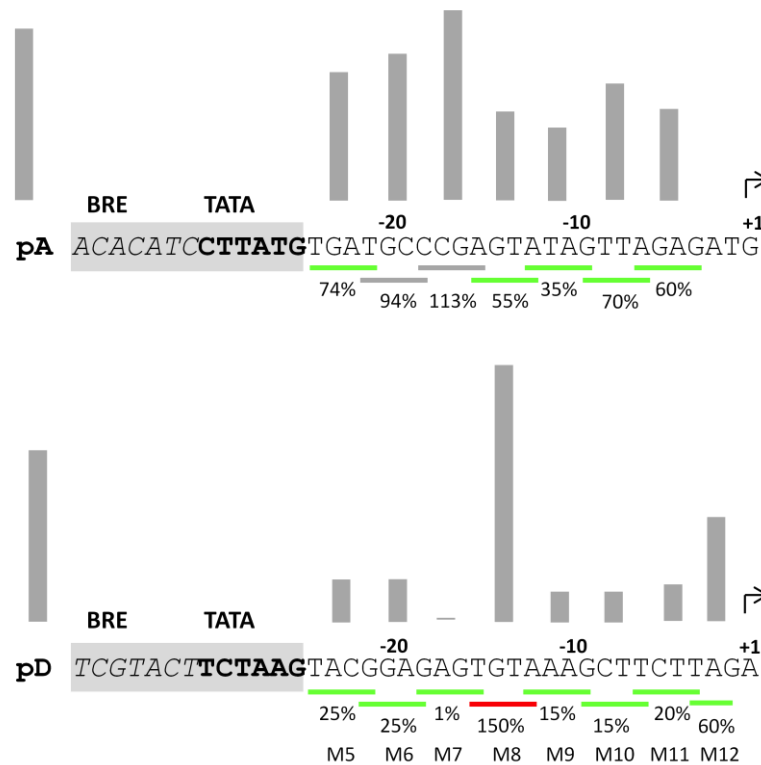


Abb. 48: Schematischer Vergleich der *scanning* Mutagenesen der P_{pA} - (Hofacker *et al.*, 2004) und P_{pD} -Promotorregion. Dargestellt sind die entsprechenden Promotoren mit der jeweiligen DNA-Sequenz bis zum Transkriptionsstart (mit Pfeil und +1 gekennzeichnet). Die BR-Elemente (kursiv) und TATA-Boxen (fett) sind grau hinterlegt. Säulen stellen schematisch die als Maß für die GvpE-vermittelte Promotoraktivität ermittelte BgaH-Aktivität der entsprechenden Mutanten dar. Die Säulen befinden sich im Zentrum der jeweiligen Mutationen, deren Lage jeweils durch eine Linie darunter gekennzeichnet ist. Unter den Linien sind die auf den entsprechenden Wildtyp bezogenen prozentualen Promotoraktivitäten angegeben. Grüne Linien markieren die Mutationen, die zu einer Reduktion der GvpE-induzierten Promotoraktivität führten, graue Linien diejenigen, die die Promotoraktivität nicht beeinflussten, die rote Linie die Mutation, die in einer deutlichen Erhöhung der Promotoraktivität resultierte. Die jeweiligen Mutationen in der P_{pD} -Promotorregion sind mit M5 bis M12 markiert.

5.3 Transfer von Promotorelementen des P_{pA} -Promotors zu P_{pD} stärkt die Aktivität von P_{pD} und zeigt die Bedeutung von BRE

Im Vergleich der Promotoraktivitäten von P_{pA} und P_{pD} weist P_{pA} die stärkere Basalaktivität auf. Das gleiche zeigt sich bei Analyse der GvpE-induzierten Aktivitäten: P_{pA} wird im Vergleich zu P_{pD} etwa 28fach stärker durch GvpE aktiviert als P_{pD} (Hofacker *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der Basenabfolge des BRE und der Stärke der P_{pA} -Basalaktivität und GvpE-vermittelten Aktivierung dieses Promotors

ermittelt werden (Hofacker *et al.*, 2004). Ein Zusammenhang zwischen den BRE- und TATA-Box-Sequenzen und der Stärke der GvpE-vermittelten Aktivierbarkeit konnte ebenfalls am P_{cA} -Promotor der c-vac Region gezeigt werden (Gregor & Pfeifer, 2005).

Um den jeweiligen Einfluss der Elemente E-UAS, BRE und TATA-Box auf die Promotoraktivität von P_{pA} und P_{pD} zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Promotorchimären hergestellt, bei denen diese Elemente zwischen P_{pA} und P_{pD} einzeln oder gemeinsam ausgetauscht wurden. Die Aktivitäten der chimären P_{pA} - und P_{pD} -Promotoren wurden mittels eines dualen Promotorkonstrukts in der früh-stationären Wachstumsphase der Transformanten simultan analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 49 zusammengefasst.

p-gvpD-mRNA										BgaH-Aktivität [mU/mg]		
basal		+pE ^{ex}	← P _{pD}				P _{pA} →			basal	+pE ^{ex}	
+	+++	WT	p-gvpD	TATA _D	BRE _D	E-UAS _D	E-UAS _A	BRE _A	TATA _A	bgaH	3,0 ± 1,5	256 ± 54
+	+++++	BRE	p-gvpD	TATA _D	BRE _A	E-UAS _D	E-UAS _A	BRE _D	TATA _A	bgaH	nd	30 ± 7
+	++++	TATA	p-gvpD	TATA _A	BRE _D	E-UAS _D	E-UAS _A	BRE _A	TATA _D	bgaH	1,5 ± 1	275 ± 23
+	++++	B+T	p-gvpD	TATA _A	BRE _A	E-UAS _D	E-UAS _A	BRE _D	TATA _D	bgaH	nd	8 ± 4
+/-	++++	invE	p-gvpD	TATA _D	BRE _D	E-UAS _A	E-UAS _D	BRE _A	TATA _A	bgaH	1,5 ± 0,4	141 ± 23
+	+++	invE+B	p-gvpD	TATA _D	BRE _A	E-UAS _A	E-UAS _D	BRE _D	TATA _A	bgaH	2,5 ± 0,6	229 ± 36
++	+++++	invE+B+T	p-gvpD	TATA _A	BRE _A	E-UAS _A	E-UAS _D	BRE _D	TATA _D	bgaH	0,2 ± 0,1	99 ± 39

Abb. 49: Schematische Darstellung der P_{pD} - P_{pA} -Promotorchimären im dualen p-gvpD- P_{pD} - P_{pA} -bgaH-Promotorkonstrukt. Die Pfeile geben die Orientierung der Promotoren an. Links sind die jeweiligen relativen p-gvpD-Transkriptmengen als Maß für die basale bzw. GvpE-induzierte (+pE^{ex}) P_{pD} -Aktivität immer in Bezug auf den P_{pD} -Wildtyp in Form von + und - angegeben, wobei (+) die Basalaktivität darstellt. (+/-) bedeutet eine reduzierte Basalaktivität, (+++) gut aktivierbar wie der entsprechende WT-Promotor, (++++ bzw. ++++++) stärker aktivierbar. Rechts sind die für den P_{pA} -Wildtyp und die verschiedenen Mutanten ermittelten spezifischen BgaH-Aktivitäten in Ab- (basal) bzw. Anwesenheit (+pE^{ex}) des Transkriptionsaktivators pGvpE angegeben.

Der gegenseitige Austausch der BRE-Sequenzen hatte auf die Basalaktivität des chimären P_{pD} -Promotors keinen Einfluss. Allerdings war dieser chimäre P_{pD} -Promotor in der BRE+pE^{ex}-Transformante etwa 4- bis 6-mal besser durch GvpE aktivierbar als der P_{pD} -Wildtyppromotor. Für den chimären P_{pA} -Promotor konnte in der BRE+pJAS-Transformante keine spezifische BgaH-Aktivität gemessen werden. Da mittels Northern-Blot geringe Mengen an bgaH-mRNA detektiert werden konnten, war der chimäre P_{pA} -Promotor in der BRE+pJAS-Transformante basal nicht vollständig inaktiv. Es ist anzunehmen, dass die Menge an BgaH unter der Nachweisgrenze des ONPG-Tests lag. Die GvpE-induzierte P_{pA} -Aktivität dieser Chimäre war ebenfalls im Vergleich zum P_{pA} -Wildtyp mehr als 8fach reduziert. Eine Veränderung der BRE-Sequenz im P_{pA} -Promotor

führte bereits früher in Abhängigkeit von der Sequenz der eingeführten Mutation entweder zu einem Verlust der basalen und starken Reduktion der GvpE-induzierten Aktivität oder zu einer stark erhöhten basalen und leicht verstärkten GvpE-stimulierten Aktivität von P_{pA} (Hofacker *et al.*, 2004). Anhand der in vorliegender Arbeit durchgeführten Analysen konnte somit erneut gezeigt werden, dass die basale Promotorstärke durch die Sequenz des BRE mitbestimmt wird.

Des Weiteren wurden die TATA-Boxen (TATA) oder TATA plus BRE (B+T) von P_{pA} durch die entsprechenden Elemente des P_{pD} -Promotors – und jeweils *vice versa* – ausgetauscht. In der TATA-Transformante war weder die Basalaktivität des chimären P_{pA} -Promotors noch die des chimären P_{pD} -Promotor beeinflusst. Allerdings konnte der chimäre P_{pD} -Promotor in dieser Transformante im Vergleich zum Wildtyppromotor 2fach stärker durch GvpE aktiviert werden. Auf die GvpE-vermittelte Aktivierung des chimären P_{pA} -Promotors hatte der Austausch der TATA-Boxen hingegen keinen Einfluss. Erfolgte jedoch zusätzlich zur TATA-Box der gegenseitige Austausch von BRE, resultierte dies in einer nicht messbaren P_{pA} -Basalaktivität und einer sehr schwachen GvpE-induzierten P_{pA} -Aktivität. Demzufolge ist BRE_D in Kombination mit TATA_D in der Umgebung des P_{pA} -Promotors offenbar nicht ausreichend, um eine messbare basale Aktivität zu erreichen. Für die Transkriptionsinitiation scheinen demnach auch die Sequenzabschnitte zwischen TATA-Box und Transkriptionsstart wichtig zu sein. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die DNA-Sequenz stromauf des Transkriptionsstarts (TS) von *p-gvpD* eine wichtige Rolle für die basale Transkriptionsinitiation an P_{pD} spielt. Die DNA-Sequenz um -10 relativ zum TS von *p-gvpA* besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Transkriptionsinitiation an P_{pA} (Hofacker *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wurde die basale P_{pD} -Aktivität durch den gegenseitigen Austausch der BRE-Sequenzen in den Mutanten BRE und B+T nicht beeinflusst, jedoch konnte in diesen Mutanten eine verstärkt GvpE-vermittelte Stimulierung des chimären P_{pD} -Promotors erfolgen. Diese Ergebnisse zeigen erneut, dass im Wildtyp BRE_A eine wichtige Rolle für die Stärke der basalen und GvpE-stimulierten P_{pA} -Aktivität spielt.

Durch den Austausch der Motive BRE und/oder TATA-Box wurden nicht nur die Basalaktivitäten der chimären Promotoren P_{pD} und P_{pA} beeinflusst, sondern auch die GvpE-vermittelte Aktivierung. Dass BRE und TATA-Box nicht nur bei der basalen Transkriptionsinitiation sondern auch bei der GvpE-vermittelten Aktivierung eine entscheidende Rolle spielen, konnte auch am P_{cA} -Promotor der *c-vac* Region gezeigt werden (Gregor & Pfeifer, 2005). P_{cA} ist basal inaktiv und kann nur durch das homologe cGvpE-Protein aktiviert werden (Krüger *et al.*, 1998; Gregor & Pfeifer, 2001). Die Substitution der TATA-Box und/oder BRE des P_{cA} -Promotors mit den entsprechenden Elementen von P_{pA} führt zwar nicht zu einer basalen Aktivität der chimären P_{cA} -

Promotoren jedoch zu einer verstärkten Aktivierbarkeit durch cGvpE (Gregor & Pfeifer, 2005). Die Motive BRE und TATA-Box sind also nicht nur für die Stärke der basale Transkription verantwortlich, sondern beeinflussen auch die Stärke der GvpE-vermittelte Aktivierung, was erneut auf ein enges Zusammenspiel zwischen GvpE, TBP und TFB hindeutet.

Die beiden E-UAS von P_{pA} und P_{pD} sind durch nur ein Nukleotid vom jeweiligen BRE getrennt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Abstand zwischen BRE und E-UAS für die GvpE-induzierte Promotoraktivierung nicht verändert werden kann (Bauer *et al.*, 2008). Weiterhin kann nur eine Promotoraktivierung durch GvpE erfolgen, wenn die DNA-Sequenz mindestens eins der beiden Elemente (proximales oder distales) der entsprechenden E-UAS in räumlicher Nähe zu dem jeweiligen BRE steht (Bauer *et al.*, 2008; diese Arbeit). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zudem festgestellt werden, dass sich die beiden E-UAS in Bezug auf die Aktivierung des P_{pA} - bzw. P_{pD} -Promotors durch GvpE unterscheiden (siehe Abschnitt 5.1). Um den Einfluss der jeweiligen E-UAS bzw. der intergenen Region auf die Stärke (basal und +pE^{ex}) des entsprechenden Promotors P_{pA} oder P_{pD} zu bestimmen, wurde die intergene Region mit beiden E-UAS invertiert. Dass in dieser invE-Mutante die Basalaktivität von P_{pD} im Vergleich zum Wildtyppromotor etwa 4fach reduziert war überraschte, da die Veränderung nur die intergene Region zwischen den beiden BRE-Sequenzen von P_{pA} und P_{pD} betraf. Es ist unwahrscheinlich, dass das proximale E-UAS_D-Element für die Initiation der basalen Transkription an P_{pD} eine Rolle spielt, da die Mutante pD1+1 und pD1+Δ2 der E-UAS-Substitutionsmutagenese (siehe Abschnitt 5.1) jeweils eine dem Wildtyp entsprechende P_{pD} -Basalaktivität aufwies. Eher wird in invE die Bindung der Proteine des basalen Transkriptionsapparates an den Promotor durch die Veränderung im Promotorbereich gestört. Eventuell wird für die Assemblierung des basalen Transkriptionsapparates auch das eine, direkt an BRE_D angrenzende Nukleotid benötigt. Dieses wurde bei invE – anders als bei der E-UAS_D-Substitutionsmutagenese – durch die Inversion der gesamten intergenen Region ebenfalls ausgetauscht (G zu T). Trotz reduzierter Basalaktivität verstärkte sich die P_{pD} -Aktivierung durch GvpE in invE im Vergleich zur induzierten Aktivität des P_{pD} -Wildtyps um den Faktor 2. Dagegen reduzierte sich die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} in dieser Mutante um den Faktor 1,8. Da bekannt ist, dass P_{pA} stärker als P_{pD} durch GvpE aktivierbar ist (Hofacker *et al.*, 2004), wurde ein Zusammenhang zwischen der Sequenz der E-UAS und Stärke der GvpE-vermittelten Promotorinduzierung bereits vermutet. Durch den Austausch der beiden E-UAS-Sequenzen konnte die stärkere Aktivierung von P_{pA} auf den P_{pD} -Promotor übertragen werden. *Vice versa* wurde die schwächere GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} auf P_{pA} übertragen. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte eine starke Bindungsaffinität des GvpE-Proteins zur E-UAS_A als zur E-UAS_D sein.

Da es sich bei invE zum Teil um die invertierte Version der B+T-Mutation handelt, ist es erstaunlich, dass sich die Auswirkungen der Mutation von Promotor zu Promotor unterscheiden. Die Kombination E-UAS_A-BRE_D-TATA_D hatte in B+T einen fast vollständigen Verlust der Aktivierbarkeit des chimären P_{pA} -Promotors zur Folge, dagegen resultierte die Kombination E-UAS_A-BRE_D-TATA_D des chimären P_{pD} -Promotors in invE in einer verstärkten GvpE-vermittelte Aktivierung. Der gleiche Effekt konnte in diesen Mutanten für die entsprechend gegenläufig orientierte Kombination E-UAS_D-BRE_A-TATA_A beobachtet werden: Der chimäre P_{pD} -Promotor konnte durch diese Kombination stärker durch GvpE aktiviert werden, wohingegen die GvpE-vermittelte Aktivierung des chimären P_{pA} -Promotors reduziert wurde. Diese Ergebnisse zeigen klar, dass der Einfluss der Elemente BRE und TATA-Box in Kontext zu dem jeweiligen Bereich stromab der TATA-Box bis zum entsprechenden Transkriptionsstart steht. Somit wird erneut die Wichtigkeit des Sequenzabschnittes zwischen TATA-Box und +1 (TS) für die jeweilige Promotoraktivität deutlich. Dies ist insofern plausibel, da für hyperthermophilen Archaea gezeigt werden konnte, dass der TBP/TFB-Komplex während der Initiation der basalen Transkription nicht nur BRE und TATA-Box sondern auch einige direkt stromab an die TATA-Box angrenzende Nukleotiden bedeckt (Hausner *et al.*, 1996; Kosa *et al.*, 1997; Littlefield *et al.*, 1999). Das TFB-Protein innerhalb dieses Komplexes interagiert dabei mit den DNA-Sequenzen beiderseits der TATA-Box. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit ein regulatorische Element an Position -4 bis -11 (relativ zum TS von p-gvpD) ermittelt werden, welches ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität des P_{pD} -Promotors ausübt. Dass die Position um -10/-11 relativ zum TS von p-gvpA die P_{pA} -Aktivität beeinflusst, ist bereits bekannt (Hofacker *et al.*, 2004).

Durch Inversion der intergenen Region zusammen mit den BRE-Sequenzen von P_{pD} und P_{pA} in invE+B konnte bei dem chimären **P_{pD}** -Promotoren basal und in Anwesenheit von pGvpE wieder P_{pD} -Wildtypaktivität erreicht werden. Auch die GvpE-vermittelte Aktivierung des chimären **P_{pA}** -Promotors zeigte das Niveau des P_{pA} -Wildtyps, obwohl das schwächere E-UAS_D an den Promotor fusioniert wurde. Die basale P_{pA} -Aktivität wurde wie auch schon in invE nicht durch die invE+B-Mutation beeinflusst. Dieses Ergebnis steht im starken Gegensatz zu den Erwartungen. Da durch den Austausch der BRE- bzw. E-UAS-Sequenzen in den Mutanten BRE und invE eine Verstärkung der GvpE-vermittelten P_{pD} - und Reduktion der P_{pA} -Aktivierung erzielt wurde, wurde angenommen, dass ein gleichzeitiger Austausch beider Motive den gleichen Effekt erzielen sollte. Warum dies nicht der Fall war, ist unklar. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wäre es sinnvoll das Experiment zu wiederholen.

Für den chimären **P_{pA}** -Promotor der invE+B+T-Mutante konnte eine 15fache Reduktion der basalen und eine fast 3fache Reduktion der GvpE-stimulierten Aktivität beobachtet

werden. Dagegen zeigte der chimäre P_{pD} -Promotor dieser Mutante sowohl eine verstärkte basale als auch GvpE-induzierte Aktivität. Dieses Ergebnis wurde erwartet, da in dieser Mutante der gesamte stärkere P_{pA} -Promotor mitsamt E-UAS gegen den schwächeren P_{pD} -Promotor plus E-UAS_D – und *vice versa* – ausgetauscht wurde. Um die Frage zu klären, ob die Region stromauf des Transkriptionsstarts jeweils die basale Aktivität und GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pA} bzw. P_{pD} beeinflusst, wurde versucht sowohl im Wildtyp-Promotorbereich als auch in der invE+B+T-Mutante die DNA-Sequenzen stromauf des jeweiligen Transkriptionsstarts bis zur jeweiligen TATA-Box auszutauschen. Trotz unzähliger Versuche konnten leider keine Konstrukte dieser Art erzeugt werden.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass es sich bei der Regulation der Stärke der GvpE-vermittelte Promotoraktivierung um ein komplexes regulatorisches Netzwerk handelt. Welche Zusammenhänge zwischen dem jeweiligen BRE bzw. TATA-Box und Aktivität des entsprechenden Promotors bestehen, konnte letztlich nicht bis ins Detail geklärt werden. Zumindest konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Promotorstärke von der Sequenz des BRE abhängig ist, wenn nicht sogar bestimmt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nicht nur die E-UAS sondern auch BRE- und TATA-Box für die Stärke der GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{pD} bzw. P_{pA} wichtig sind. Die Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass die Sequenzabschnitte zwischen TATA-Box und Transkriptionsstart von p-*gvpD* bzw. p-*gvpA* ebenfalls regulatorische Funktionen besitzen und der Einfluss der Motive BRE und TATA-Box in Kontext zu diesen Abschnitten stehen. Im Falle der beiden E-UAS-Elemente konnte die Stärke der jeweiligen GvpE-vermittelten Promotoraktivierung auf die Sequenz der jeweiligen E-UAS zurückgeführt werden.

Auffällig war, dass der Transfer von DNA-Sequenzen der P_{pD} -Promotorregion an die entsprechende Position der P_{pA} -Promotorregion in fast allen Fällen die Aktivierbarkeit des chimären P_{pA} -Promotors durch GvpE herabsetzte und im Fall des Austauschs von BRE sogar die Basalaktivität von P_{pA} fast vollständig zum Erliegen kam. Dagegen resultierte der Transfer von DNA-Sequenzen der P_{pA} -Promotorregion an die entsprechende Position der P_{pD} -Promotorregion fast durchgängig in einer Erhöhung der GvpE-induzierten P_{pD} -Aktivität. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich starken Promotoraktivitäten von P_{pD} und P_{pA} wird erkennbar, wenn man die Sequenzen der beiden Promotorregionen miteinander vergleicht. Dabei wird deutlich, dass P_{pA} bis auf ein Nukleotid mit der archaealen Konsensussequenz übereinstimmt (Abb. 50). Dagegen zeigt die TATA-Box von P_{pD} eine Übereinstimmung von fünf und das BRE sogar nur eine Übereinstimmung von drei Nukleotiden. Dadurch erkennt und bindet das TFB-Protein möglicherweise BRE_D nicht so optimal wie BRE_A, was in einer schwächeren Transkription an P_{pD} resultieren würde.

BRE TATA

RnWAAWn**YTT**AWG

P_{pA} ACCAT**ACACATCCTTATG**TGATGCCCGAGTATAGTTAGAGAT**G**

P_{pD} ATGAGT**CGTACTTCTAAG**TACGGAGAGTGTAAGCTTCTTAG**A**

Abb. 50: Vergleich der P_{pA} - und P_{pD} -Promotorregionen. Das erste Nukleotid des jeweiligen Transkriptionsstarts ist in grün und fett hervorgehoben. Die Konsensussequenzen von BRE und TATA-Box sind über den Promotorregionen angegeben (R = A oder G; n = A, C, G oder T; W = A oder T; Y = C oder T). Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz des BRE sind in rot, mit der TATA-Box in fett dargestellt.

Eine alternative Erklärung dazu könnte die Möglichkeit sein, dass BRE_A und BRE_D von unterschiedlichen TBPs erkannt und gebunden werden. Haloarchaea besitzen verschiedene TBP-Isoformen: *Hbt. salinarum* NRC-1 kodiert beispielsweise für sechs TBPs und sieben TFBs (Baliga *et al.*, 2000). Diese multiplen TBP- und TFB-Proteine können insgesamt 42 mögliche TFB/TBP-Paare bilden, welche dann die Transkription an unterschiedlichen Promotoren initiieren könnten (Baliga *et al.*, 2000). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die unterschiedlichen haloarchaealen TFBs und TBPs ähnlich zu den bakteriellen σ -Faktoren und eukaryotischen Polymerasen und Transkriptionsfaktoren ein differentielles regulatorisches Netzwerk ausbilden (Coker *et al.*, 2007; Facciotti *et al.*, 2007, 2010). Daher scheint es nicht abwegig, dass an der Regulation der Gasvesikelbildung in Haloarchaea in Abhängigkeit der Wachstumsphase und/oder Wachstumsbedingungen sowie An- und Abwesenheit von GvpE unterschiedliche TFBs und/oder TBPs beteiligt sein könnten.

Möglicherweise induziert GvpE ähnlich dem Transkriptionsaktivator Ptr2 aus *Methanocaldococcus jannaschii* die Rekrutierung von generellen Transkriptionsfaktoren (GTF) an den Promotor. Das Ptr2-Protein aus *Methanocaldococcus jannaschii* ist der wohl am besten charakterisierte archaeale Transkriptionsaktivator und homolog zu Proteinen der bakteriellen Lrp-Familie (Ouhammouch & Geiduschek, 2001). Ptr2 bindet spezifisch an zwei DNA-Sequenzen die in nahem Abstand stromauf der Promotoren des *fdxA*- und *rb2*-Gens lokalisiert sind und aktiviert die Transkriptionsinitiation an diesen Promotoren, in dem es mit TBP interagiert und dieses Protein rekrutiert (Ouhammouch *et al.*, 2003, Ouhammouch, 2004; Geiduschek & Ouhammouch, 2005). In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass das GvpE-Protein *in vitro* mit den verschiedenen TBP- und TFB-Proteinen aus *Hbt. salinarum* interagieren kann (Teufel & Pfeifer, 2010; Bleiholder *et al.*, 2011). Da im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung der Motive BRE und TATA-Box an der Promotoraktivierung gezeigt werden konnte liegt die Vermutung nahe, dass GvpE die Aktivitäten der Promotoren P_{pD} und P_{pA} ebenfalls durch Rekrutierung von TBP und/oder TFB an den entsprechenden Promotor stimuliert. Dabei darf jedoch nicht

außer Acht gelassen werden, dass in dieser Arbeit die Analyse der Auswirkungen der unterschiedlichen Promotormutationen *in vivo* in dem Rezipient *Hfx. volcanii* erfolgten. Aufgrund der Organismusspezifischen TBPs und TFBs könnte dies bedeuten, dass die so ermittelten Ergebnisse möglicherweise nicht auf die Funktionsweise des GvpE-Proteins in *Hbt. salinarum* übertragbar sind. Allerdings zeigen bereits durchgeführte Untersuchungen der P_A -Promotoren aus *Hbt. salinarum* und *Hfx. mediterranei*, dass die in dem Rezipient *Hfx. volcanii* mittels *bgaH*-Leserahmen im ONPG-Test ermittelten Promotoraktivitäten mit den jeweiligen *gvpA*-mRNA-Mengen in den entsprechenden Wildtypen korrelieren (Gregor & Pfeifer, 2001). Daher scheint die Funktion der TBPs und TFBs in *Hbt. volcanii*, *Hbt. salinarum* und *Hfx. mediterranei* gleichartig zu sein. Um jedoch eine eindeutige Aussage treffen zu können, ob GvpE in *Hbt. salinarum* an der Rekrutierung von TFB und/oder TBP beteiligt ist, sollte ein haloarchaeales *in vitro*-Transkriptionssystem generiert und verwendet werden. Solch ein System würde die Möglichkeit bieten, eventuelle Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Proteinen GvpE, TFB, TBP und der RNA-Polymerase aus *Hbt. salinarum* *in vitro* zu analysieren. Leider konnte bislang ein solches System – trotz vielfältiger Versuche – nicht aufgestellt werden.

5.4 AH4, bZIP sowie konservierte Aspartat- und Tyrosin-Reste des cGvpE-Proteins sind nicht an der Interaktion mit TfbC beteiligt

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie von vorangegangenen Arbeiten (Hofacker *et al.*, 2004; Gregor & Pfeifer, 2005; Bauer *et al.*, 2008) unterstreichen den Einfluss der BRE-Sequenz sowohl auf die basale als auch auf die GvpE vermittelte Aktivierung von P_{pD} und P_{pA} . Insgesamt spricht deshalb viel für einen Zusammenhang zwischen der Wechselwirkung von GvpE mit den an das BRE bindenden TFBs und der Promotoraktivierung. Bislang durchgeführte Interaktionsexperimente mit dem cGvpE-Protein und verschiedenen TFBs aus *Hbt. salinarum* zeigten die Wechselwirkung zwischen diesen Proteinen (Bleiholder *et al.*, 2011). Dies führte zu der Frage, ob die Interaktion zwischen GvpE und TFB eine Rolle für die GvpE-induzierte Promotoraktivierung spielt und welche Aminosäuren des GvpE-Proteins für diese Interaktion wichtig sind. Zur Klärung dieser Frage wurde damit begonnen, Protein-Protein-Interaktionsexperimente mit TfbC und verschiedenen cGvpE-Mutanten durchzuführen. Dabei lag ein besonderes Augenmerk auf den cGvpE-Mutanten, die ihre Aktivatorfunktion verloren haben. Es wurden zunächst bereits vorhandene cGvpE-Mutanten auf ihre Interaktionsfähigkeit mit dem TfbC-Protein analysiert. Es handelte sich hierbei um cGvpE-Proteine mit Mutationen in der AH4, im putativen Leucinzipper-Motiv oder konservierten Aspartat-Resten in der Region zwischen Aminosäure 50 und 100 (Plöber & Pfeifer, 2002; Anderl, 2004).

Die Interaktionsfähigkeit wurde durch Affinitätschromatographie bestimmt. Dafür wurden die rekombinant in *E. coli* produzierten und durch schrittweise Dialyse in ihre native Konformation rückgefalteten Proteine TfbC_{His} und pGvpH_{His} sowie Zelllysate der *Hfx. volcanii* Transformanten, die die entsprechenden cGvpE_{Mut}-Proteine synthetisierten, verwendet.

Für alle sechs cGvpE_{AH4}-Mutanten konnte eine Interaktion mit TfbC gezeigt werden (Tabelle 8). Die basischen Aminosäuren in der AH4 von cGvpE sind somit nicht an der Interaktion mit TfbC beteiligt. Desweiteren konnte eine Interaktion zwischen den fünf cGvpE_{Zip}-Mutanten mit Mutationen im putativen Leucinzipper in AH6 mit TfbC gezeigt werden, wobei allerdings der Nachweis der E_{Zip}L166E/TfbC-Interaktion schwierig war (Tabelle 8). Auch die Mutanten mit Mutationen in konservierten Aspartat-Resten an der Position 55, 71,72 bzw. 88 (D55A, DD71,72AA, D88A; Anderl, 2004) hatten nicht ihre Interaktionsfähigkeit mit TfbC verloren (Tabelle 8).

Tabelle 8: Ergebnisse der Analysen der bereits vorhandenen cGvpE-Mutanten.

cGvpE-Mutante	Lokalisation der Mutation	Aktivatorfunktion	Interaktion mit TfbC
AAA	basische AS der AH4	-	+
K104A/R112A	basische AS der AH4	-	+
K104A	basische AS der AH4	-	+
R111A/R112A	basische AS der AH4	+	+
R111A	basische AS der AH4	+	+
R112A	basische AS der AH4	+	+
E _{Zip} C180L	Leucinzipper-Motiv in AH6	+	+
E _{Zip} C180D	Leucinzipper-Motiv in AH6	+	+
E _{Zip} L173E/C180L	Leucinzipper-Motiv in AH6	-	+
E _{Zip} L166E	Leucinzipper-Motiv in AH6	-	+/-
E _{Zip} V159D	Leucinzipper-Motiv in AH6	-	+
Mut-1	Asp an Position 55 der cGvpE-AS-Sequenz	+	+
Mut-3	Asp an Position 71, 72 der cGvpE-AS-Sequenz	+	+
Mut-5	Asp an Position 88 der cGvpE-AS-Sequenz	-	+

Aufgrund dieser Interaktionsstudien konnte eine Beteiligung der basischen Aminosäuren innerhalb der AH4-Region an der cGvpE/TfbC-Interaktion ausgeschlossen werden. Ebenfalls nicht an der Interaktion beteiligt waren die konservierten Aspartat-Reste D55,

D71, D72 und D88 und die Schlüsselaminosäuren des putativen bZIP-Motivs in der AH6 des cGvpE-Proteins. Eine Ausnahme bildete hierbei der Leucin-Rest L166 in der AH6, dessen Substitution durch die Aminosäure Glutamat zu Schwierigkeiten beim Nachweis der Interaktion von cGvpE mit TfbC führte. Die Schwierigkeiten beim Nachweis der E_{Zip}L166E/TfbC-Interaktion könnten ein erster Hinweis darauf sein, dass die Veränderung von L166 die Interaktionsfähigkeit von GvpE mit TfbC beeinträchtigt. Dies muss aber durch weitere Mutagenesen bestätigt werden.

Vier weitere Substitutionsmutanten von cGvpE wurden in dieser Arbeit hergestellt. Dabei wurde jeweils der konservierte Aspartat-Rest an Position 117 oder 151 bzw. der konservierte Tyrosin-Rest an Position 124 oder 147 der Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins mit Alanin substituiert. Der Aminosäurerest Y147 ist in der putativen DNAB vor dem bZIP-Motiv lokalisiert (Krüger *et al.*, 1998). Zunächst wurde die Auswirkung der jeweiligen Mutation auf die Aktivatorfunktion des cGvpE-Proteins *in vivo* untersucht. Die Ermittlung der Aktivatorfunktion erfolgte in *Hfx. volcanii* Doppeltransformanten, die den *c-gvpE*_{Mut}-Leserahmen unter Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 und den *P*_{pA}-Promotor fusioniert vor dem *bgaH*-Leserahmen als Reporter enthielten. Als Maß für die cGvpE-stimulierte *P*_{pA}-Aktivität wurde die spezifische BgaH-Aktivität in den Zelllysaten der einzelnen Transformanten bestimmt. Die drei Mutanten D117A, Y147A und D151A konnten den *P*_{pA}-Promotor noch vollständig aktivieren. Dagegen erfolgte in der Transformante *P*_{pA}-*bgaH*+cGvpE_{Y124A} keine Stimulierung des Promotors. cGvpE_{Y124A} hat somit seine Aktivatorfunktion verloren. Tyrosin besitzt eine aromatische Seitenkette mit Hydroxylgruppe. Bei physiologischem pH-Wert ist Tyrosin negativ geladen und könnte somit an der Ausbildung von Salzbrücken mit Aminosäuren mit einer positiv geladenen Seitenkette beteiligt sein. In halophilen Proteinen trägt die Ausbildung eines Salzbrückensystems zur Stabilisation der Konformation bei (Dym *et al.*, 1995). Die Western-Analyse zum Nachweis der cGvpE-Expression zeigte für alle vier cGvpE_{Mut}+*P*_{pA}-*bgaH*-Transformanten vergleichbare cGvpE-Mengen. Im Falle einer Destabilisierung ist dieser Effekt demnach nicht schwerwiegend genug, um die Proteinstruktur von cGvpE_{Y124A} zu destabilisieren. Weitere Erklärungen für den Verlust der Aktivatorfunktion von cGvpE_{Y124A} könnten zum einen eine Beteiligung von Tyrosin 124 an einer möglichen GvpE/DNA-Wechselwirkung sein, zum anderen eine leichte Veränderung der Aktivator-Konformation von GvpE.

Alle vier cGvpE_{Mut}-Proteine zeigten noch eine Interaktion mit dem rekombinant in *E. coli* produzierten und rückgefalteten TfbC_{His}-Protein. Die nichterfolgte *P*_{pA}-Aktivierung in der *P*_{pA}-*bgaH*+cGvpE_{Y124A}-Transformante ist demnach nicht auf einen Verlust der Interaktionsfähigkeit der cGvpE-Mutante Y124A mit dem TfbC-Protein zurückzuführen (Tabelle 9). Die cGvpE_{D117A}/TfbC-Interaktion konnte jedoch nur in einem von drei

Experimenten gesehen werden. Dies könnte dafür sprechen, dass die Aminosäure Aspartat an Position 117 direkt oder indirekt an der Interaktion mit TfbC beteiligt sein könnte. Möglicherweise wird die Proteinstruktur durch die Substitution D117A so verändert, dass sich das Protein aufgrund der gestörten Ausbildung von Salzbrücken etwas anders faltet und die Bindestelle für TfbC verändert ist. Da cGvpE_{D117A} aber seine Funktion als Transkriptionsaktivator nicht verloren hatte und mittels Western-Blot vergleichbare Mengen an cGvpE-Protein in allen cGvpE_{Mut}-*P_{pA}*-*bgaH*-Transformanten detektiert werden konnte, kann es sich hierbei nur um eine geringfügige und lokale Veränderung des Faltungsmusters handeln. Die Ergebnisse der Untersuchungen könnten aber auch ein erster Hinweis sein, dass für die Aktivatorfunktion keine GvpE/TFB-Interaktion notwendig ist.

Tabelle 9: Ergebnisse der Analysen der cGvpE-Mutanten.

cGvpE-Mutante	Aktivatorfunktion	Interaktion mit TfbC
D117A	+	+/-
Y124A	-	+
Y147A	+	+
D151A	+	+

Insgesamt betrachtet ist der Verlust der Aktivatorfunktion der cGvpE-Mutanten _{AH4}AAA, _{AH4}K104/R112A, _{AH4}K104A, _{Zip}L173E/C180L, _{Zip}V159D, Mut-5 und cGvpE_{Y124A} nicht durch eine fehlenden cGvpE/TfbC-Interaktion begründet. Diesen Regionen werden auch bereits andere Funktionen zugewiesen: Die AH4-Region ist möglicherweise an der GvpE/DNA-Wechselwirkung und das bZIP-Motiv in der AH6-Region an der Dimerisierung von GvpE beteiligt (Krüger *et al.*, 1998). Mit den im Rahmen dieser Arbeit analysierten cGvpE-Mutanten konnten die an der Interaktion mit TfbC beteiligten Proteinbereiche nicht definiert werden. Somit war auch die Herstellung eines Zusammenhangs zwischen GvpE-vermittelter Promotoraktivierung und cGvpE/TfbC-Interaktion nicht möglich. Die Schwierigkeiten beim Nachweis der cE_{Zip}L166E- und cGvpE_{D117A}-Proteine in den Eluaten der entsprechenden Interaktionsexperimente lässt die Spekulation zu, dass diese Aminosäuren eventuell für die Interaktion mit TfbC wichtig sind. Zur Bestätigung sind jedoch weitere Experimente notwendig: Es wäre aufschlussreich diese Interaktionsexperimente mittels FPLC-basierter Ni-NTA-Affinitätschromatographie zu wiederholen, da dieses System die Verwendung größerer Proteinmengen erlaubt und weniger Fehleranfällig als das hier verwendete *batch*-Verfahren ist. Mitterlweile steht für *Hfx. volcanii* ein System zur Verfügung, mit dem durch homologe Rekombination

Leserahmen unter Kontrolle des Tryptophan-induzierbaren Promotors des *tna*-Gens in das Genom von *Hfx. volcanii* inseriert werden können (Large *et al.*, 2007). Dieses System erlaubt die homologe und gezielte Überexpression von haloarchaealen Proteinen. Um das Problem der Rückfaltung bei der heterologen Proteinexpression von TfbC zu umgehen, sollte dieses System für die Produktion dieses Proteins Anwendung finden. Durch Verwendung eines homolog produzierten TfbC-Proteins in den Interaktionsstudien könnte ausgeschlossen werden, dass die Schwierigkeiten beim Nachweis der cE_{Zip}L166E/ und cGvpE_{D117A}/TfbC-Interaktion das Ergebnis eines unvollständig rückgefalteten TfbC war.

5.5 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die DNA-Sequenzen der Motive BRE, TATA-Box und E-UAS einen signifikanten Einfluss auf die basale bzw. GvpE-induzierte Aktivität der beiden Promotoren P_{pA} und P_{pD} haben, die bei der Aktivierung der Gasvesikel-Bildung bei Haloarchaea eine wichtige Rolle spielen. Des Weiteren konnte ein regulatorisches Element in der P_{pD} -Promotorregion stromab der TATA-Box ermittelt werden, das für die Aktivität von P_{pD} besonders wichtig ist. Da für Haloarchaea kein *in vitro* Transkriptionssystem zur Verfügung steht, konnten die Effekte einzelner Mutationen auf die basale Promotoraktivität und Aktivierbarkeit des jeweiligen Promotors durch GvpE nur *in vivo* studiert werden. Auf welche Weise die eingeführten Mutationen die Transkriptionsinitiation beeinflussten, konnte somit nicht analysiert werden. Um die Hypothese zu erhärten, dass GvpE die Transkription an den Promotoren P_{pA} und P_{pD} durch Rekrutierung der generellen Transkriptionsfaktoren stimuliert, wäre es wichtig, ein haloarchaeales *in vitro*-Transkriptionssystem zur Verfügung zu haben, wie es beispielsweise für *Methanococcus*, *Pyrococcus* oder *Sulfolobus* bereits vorhanden ist (Frey *et al.*, 1990; Hüdepohl *et al.*, 1990; Hethke *et al.*, 1996; Bell *et al.*, 1998; Darcy *et al.*, 1999). Die hier durchgeführten Analysen zeigten aber die Bedeutung einzelner Motive für die Aktivierung der Transkription durch GvpE. Wie GvpE jedoch seine Aktivatorfunktion ausübt ist nach wie vor unklar. Aufgrund der hohen Salzkonzentrationen, die für die Faltung von GvpE notwendig sind, konnte eine direkte Bindung zwischen GvpE und DNA bislang noch nicht gezeigt werden. Die *Atomic-force* Mikroskopie stellt eine interessante Methode dar, mit der beispielsweise eine GvpE/DNA-Wechselwirkung dargestellt werden könnte. In die Überlegung muss jedoch ebenfalls die Möglichkeit mit einbezogen werden, dass die Promotoraktivierung nicht auf Basis einer direkten Wechselwirkung zwischen GvpE und DNA erfolgt. Möglicherweise wird durch eine Protein/Protein-Interaktion mit Komponenten des basalen Transkriptionsapparates der Promotor mittelbar ohne direkte Bindung des GvpE-Proteins an die DNA induziert. Bislang durchgeführte Interaktionsexperimente zeigen bereits die Interaktionsfähigkeit von cGvpE mit den TFB-

Proteinen aus *Hbt. salinarum* NRC-1 und den TBP-Proteinen aus *Hbt. salinarum* PHH1 (Teufel & Pfeifer, 2010; Bleiholder *et al.*, 2011). Der generelle Einfluss der einzelnen Proteine GvpE, TFB und TBP auf die Promotoraktivierung könnte wie oben schon erwähnt durch Verwendung eines *in vitro*-Transkriptionssystems studiert werden. Weiterhin könnte der Ansatz dieser Arbeit weiterverfolgt werden, indem durch *in vitro* Interaktionsexperimente mit unterschiedlichen GvpE-Mutanten der TFB- bzw. TBP-Interaktionsbereich in GvpE lokalisiert wird. Um den jeweiligen Interaktionsbereich in GvpE zu Beginn einschränken zu können, wäre es sinnvoll Mutanten mit unterschiedlich großen Deletionen im GvpE-Leserahmen zu erzeugen. Nach definitiver Lokalisation der an der Interaktion mit TFB bzw. TBP beteiligten Aminosäuren, sollten diese gezielt mutiert und die resultierenden GvpE-Mutanten auf ihre Aktivatorfunktion hin getestet werden. Der Verlust der Aktivatorfunktion sollte ein Hinweis darauf sein, dass eine Interaktion zwischen TFB bzw. TBP und GvpE für die Promotoraktivierung notwendig ist. Die Kristallisation des GvpE-Proteins und Röntgenstrukturanalysen könnten endgültig Aufschluss über die Oberflächenstruktur von GvpE geben.

6 Literatur

- Allers, T. & Mevarech, M. (2005).** Archaeal genetics - the third way. *Nature reviews. Genetics* **6**: 58-73.
- Anderl, F. (2004).** Auswirkung von Mutationen in Aspartatresten auf die Funktion des Transkriptionsaktivators GvpE aus *Halobacterium salinarum*. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999).** DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic acids research* **27**: 4658-4670.
- Archer, D. B. & King, N. R. (1984).** Isolation of gas vesicles from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of general microbiology* **130**: 167-172.
- Armbruster, V. (1997).** Regulation der Gasvesikelsynthese des halophilen Archaeons *Halobacterium salinarum* PHH4: Gerichtete Mutagenese des Transkriptionsaktivators cGvpE. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Auchtung, T. A., Takacs-Vesbach, C. D., Cavanaugh, C. M. (2006).** 16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division "Korarchaeota". *Applied and environmental microbiology* **72**: 5077-5082.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (1988).** Current Protocols in Molecular Biology Vol. 1. p. Wiley-Interscience., New York: Green Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Baliga, N. S., Goo, Y. A., Ng, W. V., Hood, L., Daniels, C. J., DasSarma, S. (2000).** Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Molecular microbiology* **36**: 1184-1185.
- Baliga, N. S., Bonneau, R., Facciotti, M. T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E. W., Shannon, P., Chiu, Y., Weng, R. S., Gan, R. R., Hung, P., Date, S. V., Marcotte, E., Hood, L., Ng, W. V. (2004).** Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome research* **14**: 2221-2234.
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D., Pace, N. R. (1996).** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 9188-9193.
- Bauer, M. (2006).** Untersuchung zur GvpE-vermittelten Aktivierung des *gvpD*-Promotors aus halophilen Archaea. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Bauer, M., Marschall, L., Reuff, M., Besche, V., Sartorius-Neef, S., Pfeifer, F. (2008).** Overlapping activator sequences determined for two oppositely oriented promoters in halophilic Archaea. *Nucleic acids research* **36**: 598-606.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (1998).** Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in microbiology* **6**: 222-228.
- Bell, S. D., Jaxel, C., Nadal, M., Kosa, P. F., Jackson, S. P. (1998).** Temperature, template topology, and factor requirements of archaeal transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 15218-15222.
- Bell, S. D., Kosa, P. L., Sigler, P. B., Jackson, S. P. (1999a).** Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13662-13667.
- Bell, S. D., Cairns, S. S., Robson, R. L., Jackson, S. P. (1999b).** Transcriptional regulation of an archaeal operon in vivo and in vitro. *Molecular cell* **4**: 971-982.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (2000a).** The role of transcription factor B in transcription initiation and promoter clearance in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *The Journal of biological chemistry* **275**: 12934-12940.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (2000b).** Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor. *The Journal of biological chemistry* **275**: 31624-31629.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (2001).** Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Current opinion in microbiology* **4**: 208-213.
- Bell, S. D., Brinkman, A. B., van der Oost, J., Jackson, S. P. (2001a).** The archaeal TFIIIE α homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO reports* **2**: 133-138.
- Bell, S. D., Magill, C. P., Jackson, S. P. (2001b).** Basal and regulated transcription in Archaea. *Biochemical Society transactions* **29**: 392-395.
- Bell, S. D. (2005).** Archaeal transcriptional regulation--variation on a bacterial theme? *Trends in microbiology* **13**: 262-265.
- Best, A. (2000).** Molekulare Funktionsanalyse des gasvesikelassoziierten GvpC-Proteins aus *Halobacterium salinarum* PHH1. Wissenschaftliche Hausarbeit, TU Darmstadt.
- Bieger, B., Essen, L. O., Oesterhelt, D. (2003).** Crystal structure of halophilic dodecin: a novel, dodecameric flavin binding protein from *Halobacterium salinarum*. *Structure* **11**: 375-385.
- Bitan-Banin, G., Ortenberg, R., Mevarech, M. (2003).** Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *Journal of bacteriology* **185**: 772-778.
- Blaseio, U. & Pfeifer, F. (1990).** Transformation of *Halobacterium halobium*: development of vectors and investigation of gas vesicle synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 6772-6776.
- Bleiholder, A. (2009).** Varianten des Transkriptionsfaktors B (TFB) in *Halobacterium salinarum*. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Bleiholder, A., Frommherz, R., Teufel, K., Pfeifer, F. (2011).** Expression of multiple *tfb* genes in different *Halobacterium salinarum* strains and interaction of TFB with transcriptional activator GvpE. *Archives of microbiology*.
- Brenneis, M., Hering, O., Lange, C., Soppe, J. (2007).** Experimental characterization of Cis-acting elements important for translation and transcription in halophilic archaea. *PLoS genetics* **3**: e229.

- Brinkman, A. B., Dahlke, I., Tuininga, J. E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E., Lebbink, J. H., Thomm, M., de Vos, W. M., van Der Oost, J. (2000). An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *The Journal of biological chemistry* **275**: 38160-38169.
- Britton, K. L., Baker, P. J., Fisher, M., Ruzheinikov, S., Gilmour, D. J., Bonete, M. J., Ferrer, J., Pire, C., Esclapez, J., Rice, D. W. (2006). Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 4846-4851.
- Brown, A. D. (1990). Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.
- Buratowski, S. & Zhou, H. (1993). Functional domains of transcription factor TFIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 5633-5637.
- Busby, S. & Ebright, R. H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**: 743-746.
- Chen, H. T. & Hahn, S. (2004). Mapping the location of TFIIB within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex: a model for the structure of the PIC. *Cell* **119**: 169-180.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**: 156-159.
- Christian, J. H. & Waltho, J. A. (1962). Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **65**: 506-508.
- Chu, L. J., Chen, M. C., Setter, J., Tsai, Y. S., Yang, H., Fang, X., Ting, Y. S., Shaffer, S. A., Taylor, G. K., von Haller, P. D., Goodlett, D. R., Ng, W. V. (2011). New structural proteins of *Halobacterium salinarum* gas vesicle revealed by comparative proteomics analysis. *Journal of proteome research* **10**: 1170-1178.
- Cline, S. W. & Doolittle, W. F. (1987). Efficient transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *Journal of bacteriology* **169**: 1341-1344.
- Cline, S. W., Schalkwyk, L. C., Doolittle, W. F. (1989). Transformation of the archaeobacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. *Journal of bacteriology* **171**: 4987-4991.
- Coker, J. A., DasSarma, P., Kumar, J., Muller, J. A., DasSarma, S. (2007). Transcriptional profiling of the model Archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1: responses to changes in salinity and temperature. *Saline systems* **3**: 6.
- Dahlke, I. & Thomm, M. (2002). A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic acids research* **30**: 701-710.
- Danner, S. & Soppa, J. (1996). Characterization of the distal promoter element of halobacteria in vivo using saturation mutagenesis and selection. *Molecular microbiology* **19**: 1265-1276.
- Darcy, T. J., Hausner, W., Awery, D. E., Edwards, A. M., Thomm, M., Reeve, J. N. (1999). *Methanobacterium thermoautotrophicum* RNA polymerase and transcription in vitro. *Journal of bacteriology* **181**: 4424-4429.
- DeLong, E. F. & Pace, N. R. (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic biology* **50**: 470-478.
- Dennis, P. P. (1997). Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**: 1007-1010.
- Dennis, P. P. & Shimmin, L. C. (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiology and molecular biology reviews* : **MMBR** **61**: 90-104.
- Dym, O., Mevarech, M., Sussman, J. L. (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaeobacterium. *Science* **267**: 1344-1346.
- Ebel, C., Faou, P., Kernel, B., Zaccai, G. (1999). Relative role of anions and cations in the stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *Biochemistry* **38**: 9039-9047.
- Eick, D., Wedel, A., Heumann, H. (1994). From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. *Trends in genetics* : **TIG** **10**: 292-296.
- Eisenberg, H., Mevarech, M., Zaccai, G. (1992). Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Advances in protein chemistry* **43**: 1-62.
- Elevi Bardavid, R., Khristo, P., Oren, A. (2008). Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles : life under extreme conditions* **12**: 5-14.
- Elkins, J. G., Podar, M., Graham, D. E., Makarova, K. S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B. P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E. V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M., Stetter, K. O. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 8102-8107.
- Ellenberger, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K., Harrison, S. C. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* **71**: 1223-1237.
- Englert, C., Horne, M., Pfeifer, F. (1990). Expression of the major gas vesicle protein gene in the halophilic archaeobacterium *Haloferax mediterranei* is modulated by salt. *Molecular & general genetics* : **MGG** **222**: 225-232.
- Englert, C., Krüger, K., Offner, S., Pfeifer, F. (1992a). Three different but related gene clusters encoding gas vesicles in halophilic archaea. *Journal of molecular biology* **227**: 586-592.
- Englert, C., Wanner, G., Pfeifer, F. (1992b). Functional analysis of the gas vesicle gene cluster of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* defines the vac-region boundary and suggests a regulatory role for the *gvpD* gene or its product. *Molecular microbiology* **6**: 3543-3550.
- Englert, C. & Pfeifer, F. (1993). Analysis of gas vesicle gene expression in *Haloferax mediterranei* reveals that GvpA and GvpC are both gas vesicle structural proteins. *The Journal of biological chemistry* **268**: 9329-9336.

- Enoru-Eta, J., Gigot, D., Thia-Toong, T. L., Glansdorff, N., Charlier, D. (2000).** Purification and characterization of Sa-Irp, a DNA-binding protein from the extreme thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* homologous to the bacterial global transcriptional regulator Lrp. *Journal of bacteriology* **182**: 3661-3672.
- Facciotti, M. T., Reiss, D. J., Pan, M., Kaur, A., Vuthoori, M., Bonneau, R., Shannon, P., Srivastava, A., Donohoe, S. M., Hood, L. E., Baliga, N. S. (2007).** General transcription factor specified global gene regulation in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 4630-4635.
- Facciotti, M. T., Pang, W. L., Lo, F. Y., Whitehead, K., Koide, T., Masumura, K., Pan, M., Kaur, A., Larsen, D. J., Reiss, D. J., Hoang, L., Kalisiak, E., Northen, T., Trauger, S. A., Siuzdak, G., Baliga, N. S. (2010).** Large scale physiological readjustment during growth enables rapid, comprehensive and inexpensive systems analysis. *BMC systems biology* **4**: 64.
- Fiorentino, G., Cannio, R., Rossi, M., Bartolucci, S. (2003).** Transcriptional regulation of the gene encoding an alcohol dehydrogenase in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* involves multiple factors and control elements. *Journal of bacteriology* **185**: 3926-3934.
- Frey, G., Thomm, M., Brudigam, B., Gohl, H. P., Hausner, W. (1990).** An archaeobacterial cell-free transcription system. The expression of tRNA genes from *Methanococcus vannielii* is mediated by a transcription factor. *Nucleic acids research* **18**: 1361-1367.
- Frolow, F., Harel, M., Sussman, J. L., Mevarech, M., Shoham, M. (1996).** Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nature structural biology* **3**: 452-458.
- Geiduschek, E. P. & Ouhammouch, M. (2005).** Archaeal transcription and its regulators. *Molecular microbiology* **56**: 1397-1407.
- Grabowski, B. & Kelman, Z. (2003).** Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annual review of microbiology* **57**: 487-516.
- Grant, W. D. & Larsen, H. (1989).** Extremely halophilic archaeobacteria. Order Halobacteriales ord. nov., p. 2216-2233. in Staley JT, B.M., Pfennig N, Holt JG, Ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*: Williams and Wilkins, Baltimore.
- Gregor, D. & Pfeifer, F. (2001).** Use of a halobacterial *bgaH* reporter gene to analyse the regulation of gene expression in halophilic archaea. *Microbiology* **147**: 1745-1754.
- Gregor, D. (2002).** Untersuchungen zur Regulation von Promotoren aus halophilen Archaea mit dem *bgaH*-Reportergen. Dissertation, TU Darmstadt.
- Gregor, D. & Pfeifer, F. (2005).** *In vivo* analyses of constitutive and regulated promoters in halophilic archaea. *Microbiology* **151**: 25-33.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., Plemenitas, A. (2000).** Hypersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS microbiology ecology* **32**: 235-240.
- Hain, J., Reiter, W. D., Hüdepohl, U., Zillig, W. (1992).** Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucleic acids research* **20**: 5423-5428.
- Hanzelka, B. L., Darcy, T. J., Reeve, J. N. (2001).** TFE, an archaeal transcription factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* related to eucaryal transcription factor TFIIIEalpha. *Journal of bacteriology* **183**: 1813-1818.
- Hausner, W., Frey, G., Thomm, M. (1991).** Control regions of an archaeal gene. A TATA box and an initiator element promote cell-free transcription of the tRNA(Val) gene of *Methanococcus vannielii*. *Journal of molecular biology* **222**: 495-508.
- Hausner, W. & Thomm, M. (1993).** Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*. *The Journal of biological chemistry* **268**: 24047-24052.
- Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C., Thomm, M. (1996).** Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* **271**: 30144-30148.
- Hausner, W. & Thomm, M. (2001).** Events during initiation of archaeal transcription: open complex formation and DNA-protein interactions. *Journal of bacteriology* **183**: 3025-3031.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E., Downing, K. H. (1990).** Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *Journal of molecular biology* **213**: 899-929.
- Hethke, C., Geerling, A. C., Hausner, W., de Vos, W. M., Thomm, M. (1996).** A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic acids research* **24**: 2369-2376.
- Hochheimer, A., Hedderich, R., Thauer, R. K. (1999).** The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA binding properties and transcriptional regulation. *Molecular microbiology* **31**: 641-650.
- Hofacker, A., Schmitz, K. M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S., Pfeifer, F. (2004).** GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the *p-gvp* genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* **150**: 1829-1838.
- Holmes, M. L. & Dyll-Smith, M. L. (1990).** A plasmid vector with a selectable marker for halophilic archaeobacteria. *Journal of bacteriology* **172**: 756-761.
- Holmes, M. L. & Dyll-Smith, M. L. (1991).** Mutations in DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology* **173**: 642-648.
- Holmes, M. L., Nuttall, S. D., Dyll-Smith, M. L. (1991).** Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase. *Journal of bacteriology* **173**: 3807-3813.
- Holmes, M. L., Scopes, R. K., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Englert, C., Pfeifer, F., Dyll-Smith, M. L. (1997).** Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochimica et biophysica acta* **1337**: 276-286.
- Holmes, M. L. & Dyll-Smith, M. L. (2000).** Sequence and expression of a halobacterial beta-galactosidase gene. *Molecular microbiology* **36**: 114-122.

- Horne, M., Englert, C., Pfeifer, F. (1988).** Two genes encoding gas vacuole proteins in *Halobacterium halobium*. *Molecular & general genetics* : MGG **213**: 459-464.
- Horne, M. & Pfeifer, F. (1989).** Expression of two gas vacuole protein genes in *Halobacterium halobium* and other related species. *Molecular & general genetics* : MGG **218**: 437-444.
- Horne, M., Englert, C., Wimmer, C., Pfeifer, F. (1991).** A DNA region of 9 kbp contains all genes necessary for gas vesicle synthesis in halophilic archaeobacteria. *Molecular microbiology* **5**: 1159-1174.
- Hu, J. C., O'Shea, E. K., Kim, P. S., Sauer, R. T. (1990).** Sequence requirements for coiled-coils: analysis with lambda repressor-GCN4 leucine zipper fusions. *Science* **250**: 1400-1403.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., Stetter, K. O. (2002).** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.
- Hüdepohl, U., Reiter, W. D., Zillig, W. (1990).** In vitro transcription of two rRNA genes of the archaeobacterium *Sulfolobus* sp. B12 indicates a factor requirement for specific initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 5851-5855.
- Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A., Zillig, W. (1983).** Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *The EMBO journal* **2**: 1291-1294.
- Jost, M. (1965).** Die Ultrastruktur von *Oscillatoria rubescens*. *D C Arch Microbiol* **50**: 211-245.
- Kandler, O. & König, H. (1998).** Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cellular and molecular life sciences* : CMLS **54**: 305-308.
- Karadzic, I. M. & Maupin-Furlow, J. A. (2005).** Improvement of two-dimensional gel electrophoresis proteome maps of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *Proteomics* **5**: 354-359.
- Kinsman, R., Walsby, A. E., Hayes, P. K. (1995).** GvpCs with reduced numbers of repeating sequence elements bind to and strengthen cyanobacterial gas vesicles. *Molecular microbiology* **17**: 147-154.
- Kosa, P. F., Ghosh, G., DeDecker, B. S., Sigler, P. B. (1997).** The 2.1-Å crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein/transcription factor (II)B core/TATA-box. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 6042-6047.
- Krantz, M. J. & Ballou, C. E. (1973).** Analysis of *Halobacterium halobium* gas vesicles. *Journal of bacteriology* **114**: 1058-1067.
- Krüger, K. & Pfeifer, F. (1996).** Transcript analysis of the c-vac region and differential synthesis of the two regulatory gas vesicle proteins GvpD and GvpE in *Halobacterium salinarum* PHH4. *Journal of bacteriology* **178**: 4012-4019.
- Krüger, K., Hermann, T., Armbruster, V., Pfeifer, F. (1998).** The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein. *Journal of molecular biology* **279**: 761-771.
- Kushner, D.J. (1985).** The Halobacteriaceae p. 171-214. In C.R. Woese and R.S. Wolfe (ed.), *The bacteria. A treatise on structure and function*, vol. VIII Archaeobacteria. Academic Press, Inc., Orlando Fla.
- Lagrange, T., Kapanidis, A. N., Tang, H., Reinberg, D., Ebricht, R. H. (1998).** New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes & development* **12**: 34-44.
- Lam, W. L. & Doolittle, W. F. (1989).** Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 5478-5482.
- Lam, W. L. & Doolittle, W. F. (1992).** Mevinolin-resistant mutations identify a promoter and the gene for a eukaryote-like 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *The Journal of biological chemistry* **267**: 5829-5834.
- Lange, C., Zaigler, A., Hammelmann, M., Twellmeyer, J., Raddatz, G., Schuster, S. C., Oesterhelt, D., Soppa, J. (2007).** Genome-wide analysis of growth phase-dependent translational and transcriptional regulation in halophilic archaea. *BMC genomics* **8**: 415.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., Zillig, W. (1995).** Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 5768-5772.
- Lanyi, J. K. (1974).** Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological reviews* **38**: 272-290.
- Large, A., Stamme, C., Lange, C., Duan, Z., Allers, T., Soppa, J., Lund, P. A. (2007).** Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene. *Molecular microbiology* **66**: 1092-1106.
- Larsen, H., Omang, S., Steensland, H. (1967).** On the gas vacuoles of the halobacteria. *Archiv für Mikrobiologie* **59**: 197-203.
- Lee, S. J., Engelmann, A., Horlacher, R., Qu, Q., Vierke, G., Hebbeln, C., Thomm, M., Boos, W. (2003).** TrmB, a sugar-specific transcriptional regulator of the trehalose/maltose ABC transporter from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *The Journal of biological chemistry* **278**: 983-990.
- Leonard, P. M., Smits, S. H., Sedelnikova, S. E., Brinkman, A. B., de Vos, W. M., van der Oost, J., Rice, D. W., Rafferty, J. B. (2001).** Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *The EMBO journal* **20**: 990-997.
- Littlefield, O., Korkhin, Y., Sigler, P. B. (1999).** The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13668-13673.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Madern, D., Ebel, C., Zaccai, G. (2000).** Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles : life under extreme conditions* **4**: 91-98.
- Madigan, M. T. & Oren, A. (1999).** Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current opinion in microbiology* **2**: 265-269.
- Marquez, E. D. & Brodie, A. F. (1973).** The effect of cations on the heat stability of a halophilic nitrate reductase. *Biochimica et biophysica acta* **321**: 84-89.

- Marschaus, L. (2007).** Untersuchung zur Regulation der divergenten Promotoren *PpA* und *PpD* aus *Halobacterium salinarum* PHH1. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- McMaster, T. J., Miles, M. J., Walsby, A. E. (1996).** Direct observation of protein secondary structure in gas vesicles by atomic force microscopy. *Biophysical journal* **70**: 2432-2436.
- Mwatha, W. E. & Grant, W. D. (1993).** *Natronobacterium vacuolata* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon isolated from Lake Magadii, Kenya. *Int J System Bacteriol* **43**: 401-404.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T. A., Welti, R., Goo, Y. A., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M. J., Hough, D. W., Maddocks, D. G., Jablonski, P. E., Krebs, M. P., Angevine, C. M., Dale, H., Isenbarger, T. A., Peck, R. F., Pohlschroder, M., Spudich, J. L., Jung, K. W., Alam, M., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C. J., Dennis, P. P., Omer, A. D., Ebhardt, H., Lowe, T. M., Liang, P., Riley, M., Hood, L., DasSarma, S. (2000).** Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 12176-12181.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1971).** Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature: New biology* **233**: 149-152.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1973).** Functions of a new photoreceptor membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 2853-2857.
- Offner, S. & Pfeifer, F. (1995).** Complementation studies with the gas vesicle-encoding p-vac region of *Halobacterium salinarum* PHH1 reveal a regulatory role for the p-gvpDE genes. *Molecular microbiology* **16**: 9-19.
- Offner, S., Wanner, G., Pfeifer, F. (1996).** Functional studies of the *gvpACNO* operon of *Halobacterium salinarum* reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *Journal of bacteriology* **178**: 2071-2078.
- Offner, S., Hofacker, A., Wanner, G., Pfeifer, F. (2000).** Eight of fourteen *gvp* genes are sufficient for formation of gas vesicles in halophilic archaea. *Journal of bacteriology* **182**: 4328-4336.
- Oren, A. (1999).** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **63**: 334-348.
- Ouhammouch, M. & Geiduschek, E. P. (2001).** A thermostable platform for transcriptional regulation: the DNA-binding properties of two Lrp homologs from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *The EMBO journal* **20**: 146-156.
- Ouhammouch, M., Dewhurst, R. E., Hausner, W., Thomm, M., Geiduschek, E. P. (2003).** Activation of archaeal transcription by recruitment of the TATA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5097-5102.
- Ouhammouch, M. (2004).** Transcriptional regulation in Archaea. *Current opinion in genetics & development* **14**: 133-138.
- Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1992).** Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annual review of biochemistry* **61**: 1053-1095.
- Palmer, B. R. & Marinus, M. G. (1994).** The dam and dcm strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene* **143**: 1-12.
- Palmer, J. R. & Daniels, C. J. (1995).** In vivo definition of an archaeal promoter. *Journal of bacteriology* **177**: 1844-1849.
- Patenge, N., Haase, A., Bolhuis, H., Oesterhelt, D. (2000).** The gene for a halophilic beta-galactosidase (*bgaH*) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promoter analyses in *Halobacterium salinarum*. *Molecular microbiology* **36**: 105-113.
- Peng, N., Xia, Q., Chen, Z., Liang, Y. X., She, Q. (2009).** An upstream activation element exerting differential transcriptional activation on an archaeal promoter. *Molecular microbiology* **74**: 928-939.
- Petrovic, U., Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A. (2002).** Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Molecular microbiology* **45**: 665-672.
- Pfeifer, F. & Ghahraman, P. (1993).** Plasmid pHH1 of *Halobacterium salinarum*: characterization of the replicon region, the gas vesicle gene cluster and insertion elements. *Molecular & general genetics* : *MGG* **238**: 193-200.
- Pfeifer, F., Griffing, J., Oesterhelt, D. (1993).** The *fdx* gene encoding the [2Fe--2S] ferredoxin of *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*). *Molecular & general genetics* : *MGG* **239**: 66-71.
- Pfeifer, F.; Offner, S.; Krüger, K.; Ghahraman, P.; Englert, C. (1994).** Transformation of halophilic archaea and investigation of gas-vesicle synthesis. *Systematic and applied microbiology* **16**: 569-577.
- Pfeifer, F., Krüger, K., Röder, R., Mayr, A., Ziesche, S., Offner, S. (1997).** Gas vesicle formation in halophilic Archaea. *Archives of microbiology* **167**: 259-268.
- Pfeifer, F., Gregor, D., Hofacker, A., Plößner, P., Zimmermann, P. (2002).** Regulation of gas vesicle formation in halophilic archaea. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **4**: 175-181.
- Pfeifer, F., Frommherz, R., Faist, K., Hechler, T., Teufel, K., Marschaus, L. (2011).** Effect of anoxic conditions and temperature on gas vesicle formation in *Halobacterium salinarum*. In: *Halophiles and Hypersaline Environments* (Ed. Ventosa A, Oren A, Ma Y), Springer Verlag, Chapter 13, pp 237-248.
- Pfeiffer, F., Broicher, A., Gillich, T., Klee, K., Mejia, J., Rampp, M., Oesterhelt, D. (2008).** Genome information management and integrated data analysis with HaloLex. *Archives of microbiology* **190**: 281-299.
- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M., Herzberg, O. (1998).** Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure* **6**: 75-88.
- Pire, C., Esclapez, J., Ferrer, J., Bonete, M. J. (2001).** Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS microbiology letters* **200**: 221-227.

- Plöber, P. (1998).** Charakterisierung des halobakteriellen Transkriptionsaktivators cGvpE aus *Halobacterium salinarum* PHH4. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Plöber, P. (2002).** Der Transkriptionsaktivator cGvpE aus dem extrem halophilen Archaeon *Halobacterium salinarum* PHH4: ein basisches Leucinzipper-Protein. Dissertation, TU Darmstadt.
- Plöber, P. & Pfeifer, F. (2002).** A bZIP protein from halophilic archaea: structural features and dimer formation of cGvpE from *Halobacterium salinarum*. *Molecular microbiology* **45**: 511-520.
- Qureshi, S. A., Bell, S. D., Jackson, S. P. (1997).** Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *The EMBO journal* **16**: 2927-2936.
- Qureshi, S. A. & Jackson, S. P. (1998).** Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Molecular cell* **1**: 389-400.
- Rao, J. K. & Argos, P. (1981).** Structural stability of halophilic proteins. *Biochemistry* **20**: 6536-6543.
- Reiter, W. D., Hüdepohl, U., Zillig, W. (1990).** Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 9509-9513.
- Renfrow, M. B., Naryshkin, N., Lewis, L. M., Chen, H. T., Ebright, R. H., Scott, R. A. (2004).** Transcription factor B contacts promoter DNA near the transcription start site of the archaeal transcription initiation complex. *The Journal of biological chemistry* **279**: 2825-2831.
- Reuff, M. (2005).** Untersuchungen zur Bindung des mcGvpE am gvpA-Promotor von *Haloferax mediterranei*. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Reysenbach, A. L., Longnecker, K., Kirshtein, J. (2000).** Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and environmental microbiology* **66**: 3798-3806.
- Rivera, M. C., Jain, R., Moore, J. E., Lake, J. A. (1998).** Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6239-6244.
- Röder, R. & Pfeifer, F. (1996).** Influence of salt on the transcription of the gas-vesicle genes of *Haloferax mediterranei* and identification of the endogenous transcriptional activator gene. *Microbiology* **142**: 1715-1723.
- Rodriguez-Valera, F.; Juez, G., Kushner, D. (1983).** *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Systematic and Applied Microbiology* **4**: 369-381.
- Rowlands, T., Baumann, P., Jackson, S. P. (1994).** The TATA-binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaeobacteria. *Science* **264**: 1326-1329.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook & Russell (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edition, Cold Spring Harbor, New York.
- Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2004).** In vivo studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Molecular microbiology* **51**: 579-588.
- Sartorius-Neef, S. (2005).** Untersuchungen zur Initiation der Translation in halophilen Archaea. Dissertation, TU Darmstadt.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* **166**: 368-379.
- Scheuch, S. (2003).** Untersuchungen zur Interaktion der beiden regulatorischen Proteine GvpD und GvpE in halophilen Archaea. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Scheuch, S. & Pfeifer, F. (2007).** GvpD-induced breakdown of the transcriptional activator GvpE of halophilic archaea requires a functional p-loop and an arginine-rich region of GvpD. *Microbiology* **153**: 947-958.
- Scheuch, S., Marschall, L., Sartorius-Neef, S., Pfeifer, F. (2008).** Regulation of gvp genes encoding gas vesicle proteins in halophilic Archaea. *Archives of Microbiology* **190**: 333-339.
- Shear, H. & Walsby, A. E. (1975).** An investigation into the possible light-shielding role of gas vacuoles in a planctonic blue-green algae. *British Phycological Journal* **10**: 241-251.
- Simon, R. (1981).** Morphology and protein composition of gas vesicles from wild type and gas vacuole deficient strains of *Halobacterium salinarum* strain 5. *Journal of general microbiology* **125**: 103-111.
- Soppa, J. & Link, T. A. (1997).** The TATA-box-binding protein (TBP) of *Halobacterium salinarum*. Cloning of the *tbp* gene, heterologous production of TBP and folding of TBP into a native conformation. *European journal of biochemistry / FEBS* **249**: 318-324.
- Soppa, J. (1999).** Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promoter elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box. *Molecular microbiology* **31**: 1589-1592.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* **98**: 503-517.
- Stoeckenius, W. & Kunau, W. H. (1968).** Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. *The Journal of cell biology* **38**: 337-357.
- Teufel, K., Bleiholder, A., Griesbach, T., Pfeifer, F. (2008).** Variations in the multiple *tbp* genes in different *Halobacterium salinarum* strains and their expression during growth. *Archives of microbiology* **190**: 309-318.
- Teufel, K. & Pfeifer, F. (2010).** Interaction of transcription activator GvpE with TATA-box-binding proteins of *Halobacterium salinarum*. *Archives of microbiology* **192**: 143-149.
- Thomm, M. (1996).** Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS microbiology reviews* **18**: 159-171.
- Thompson, D. K., Palmer, J. R., Daniels, C. J. (1999).** Expression and heat-responsive regulation of a TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*. *Molecular microbiology* **33**: 1081-1092.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350-4354.
- Walsby, A. E. (1969).** The permeability of bluegreen algal gas vacuole membranes to gas. *Proc R Soc London Ser B* **173**: 235-255.
- Walsby, A. E. (1972).** Structure and function of gas vacuoles. *Bacteriological reviews* **36**: 1-32.
- Walsby, A. E. (1981a).** Cyanobacteria: planktonic gas-vacuolate forms, p. 224-235. In: M. P. Starr, H. G. Stolp, H. Triiper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.
- Walsby, A. E. (1981b).** Gas-vacuolate bacteria (apart from cyanobacteria), p. 441-447. In: M. P. Starr, H. G. Stolp, H. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.
- Walsby, A. E. & Hayes, P. K. (1989).** Gas vesicle proteins. *The Biochemical journal* **264**: 313-322.
- Walsby, A. E. (1994).** Gas vesicles. *Microbiological reviews* **58**: 94-144.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5088-5090.
- Woese, C. R., Magrum, L. J., Fox, G. E. (1978).** Archaeobacteria. *Journal of molecular evolution* **11**: 245-251.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 4576-4579.
- Wright, D. B., Banks, D. D., Lohman, J. R., Hilsenbeck, J. L., Gloss, L. M. (2002).** The effect of salts on the activity and stability of *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii* dihydrofolate reductases. *Journal of molecular biology* **323**: 327-344.
- Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N., Tanaka, N. (2002).** The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nature structural biology* **9**: 691-695.
- Zaccai, G., Cendrin, F., Haik, Y., Borochoy, N., Eisenberg, H. (1989).** Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *Journal of molecular biology* **208**: 491-500.
- Zaigler, A., Schuster, S. C., Soppe, J. (2003).** Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*. *Molecular microbiology* **48**: 1089-1105.
- Zhang, H., Cui, P., Lin, L., Shen, P., Tang, B., Huang, Y. P. (2009).** Transcriptional analysis of the *hsp70* gene in a haloarchaeon *Natrinema* sp. J7 under heat and cold stress. *Extremophiles : life under extreme conditions* **13**: 669-678.
- Zimmermann, P. & Pfeifer, F. (2003).** Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloferax mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE. *Molecular microbiology* **49**: 783-794.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Ara	Arabinose
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>bgaH</i>	Gen für halobakterielle β -Glaktosidase
bp	Basenpaare
BRE	<i>transcription factor B recognition element</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Cytosin in Nukleinsäuresequenzen, Cystein in Aminosäuresequenzen
C-Terminus	Ende eines Proteins oder Polypeptids mit einer freien Carboxylgruppe
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
°C	Grad Celsius
D	Asparaginsäure in Aminosäuresequenzen
Da	Dalton
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Glutaminsäure in Aminosäuresequenzen
EDTA	Ethylen Diamin Tetra Essigsäure
ex	Expression unter der Kontrolle des <i>fdx</i> -Promotors in pJAS35
<i>et al.</i>	und andere
<i>fdx</i>	Ferredoxin-Gen
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Gramm
G	Guanin in Nukleinsäuresequenzen, Glycin in Aminosäuresequenzen
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
<i>gvp</i>	<i>gas vesicle protein</i> -Gen

Gvp	gas vesicle protein
h	Stunde
<i>Hbt.</i>	<i>Halobacterium</i>
<i>Hfx.</i>	<i>Haloferax</i>
I	Isoleucin in Aminosäuresequenzen
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalaktosid
K	Lysin in Aminosäuresequenzen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	Leucin in Aminosäuresequenzen
Lac	Lactose
m	milli
M	Molar, Methionin in Aminosäuresequenzen
μ	micro
mg	Milligramm
min	Minute
μl	Mikroliter
mM	millimolar
μm	Mikrometer
mRNA	Boten (messenger) Ribonukleinsäure
mU	milli Unit
Mut	gentechnisch verändertes Gen oder Protein
n	nano
N	Asparagin in Aminosäuresequenzen
N-Terminus	Ende eines Proteins oder Polypeptids mit freier Aminogruppe
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
P	Prolin in Aminosäuresequenzen
PAGE	Poly-Acrylamid Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R	Arginin in Aminosäuresequenzen, Adenin oder Guanin in Nukleinsäuresequenzen
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Sodium Saline Citrate
T	Thymin in Nukleinsäuresequenzen, Threonin in Aminosäuresequenzen
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TEMED	Tetra-methyl-ethylen-diamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UAS	<i>upstream activator sequence</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
V	Volt, Valin in Aminosäuresequenzen
Vac	Gasvesikelphänotyp
v/v	Volumen pro Volumen
VM	Vollmedium
w/v	Gewicht pro Volumen
W	Adenin oder Thymin in Nukleinsäuresequenzen
WT	Wildtyp
Y	Thyrosin in Aminosäuresequenzen, Cytosin oder Thymin
z.B.	zum Beispiel
ZT	Zimmertemperatur

7.2 Publikationen

Publikationen in wissenschaftlichen Journalen

Bauer, M., Marschaus, L., Reuff, M., Besche, V., Sartorius-Neef, S., Pfeifer, F. (2008).

Overlapping activator sequences determined for two oppositely oriented promoters in halophilic Archaea. *Nucleic acids research* **36**: 598-606.

Scheuch, S., Marschaus, L., Sartorius-Neef, S., Pfeifer, F. (2008).

Regulation of gvp genes encoding gas vesicle proteins in halophilic Archaea. *Archives of Microbiology* **190**: 333-339.

Pfeifer, F., Frommherz, R., Faist, K., Hechler, T., Teufel K, Marschaus, L. (2011).

Effect of anoxic conditions and temperature on gas vesicle formation in *Halobacterium salinarum*. In: *Halophiles and Hypersaline Environments* (Ed. Ventosa A, Oren A, Ma Y), Springer Verlag, Chapter 13, pp 237-248.

Marschaus, L. & Pfeifer, F. (2012).

A Dual Promoter Region with Overlapping Activator Sequences Drives the Expression of Gas Vesicle Protein Genes in Haloarchaea. *Microbiology* (eingereicht im April 2012)

Publikationen auf wissenschaftlichen Kongressen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden regelmäßig auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

- Posterpräsentation auf der Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Frankfurt, 9.-11. März 2008
- Vortrag auf der Jahrestagung des Schwerpunktprogrammes „SPP1112: Genomfunktion und Genregulation in Archaea“ in Schmitten, 22.-23. September 2008
- Posterpräsentation auf der Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Hannover, 28.-31. März 2010
- Posterpräsentation auf der Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Karlsruhe, 3.-6. April 2011

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Larissa Renée Marschaus
Geburtsdatum	11.03.1980
Geburtsort	Hanau, Deutschland

Schulbildung

2001	Abitur; Weibelfeldschule, Gymnasiale Oberstufe, Dreieich, Deutschland
------	---

Akademische Ausbildung

2007-2011	Promotionsarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt Titel: „Analyse einer divergenten Promotorregion in <i>Halobacterium salinarum</i> : Wirkung einzelner Promotorelemente und Stärke der Aktivierung
2007	Abschluss des Studiums der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt als Diplom-Biologin
2007	Diplomarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt Titel: „Untersuchung zur Regulation der divergenten Promotoren P_{pA} und P_{pD} aus <i>Halobacterium salinarum</i> PHH1
2001-2007	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt

7.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von November 2007 bis Juli 2011 angefertigt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 09.07.2012

(Larissa Marschaus)